

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Programa de doctorado: QUÍMICA FINA

Título de la tesis:

MICROEXTRACCIÓN CON DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES PARA  
LA DETERMINACIÓN ESTEREOSELECTIVA DE CONTAMINANTES  
QUIRALES EMERGENTES

SUPRAMOLECULAR SOLVENT-BASED MICROEXTRACTION FOR THE  
STEREOSELECTIVE DETERMINATION OF EMERGING CHIRAL  
POLLUTANTS

Directoras:

MARÍA DOLORES SICILIA CRIADO Y MARÍA DEL CARMEN CABALLO  
LINARES

Autor de la tesis: ANA BELÉN LARA FUENTES

Fecha de depósito tesis en el Idep: 2 de junio de 2020

TITULO: *Microextracción con disolventes supramoleculares para la determinación estereoselectiva de contaminantes quirales emergentes*

AUTOR: *Ana Belén Lara Fuentes*

---

© Edita: UCOPress. 2020  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---





Universidad de Córdoba



Departamento de Química  
Analítica



# **MICROEXTRACCIÓN CON DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES PARA LA DETERMINACIÓN ESTEREOSELECTIVA DE CONTAMINANTES EMERGENTES QUIRALES**

---

**TESIS DOCTORAL**

Ana Belén Lara Fuentes

Córdoba, 2020





**Tesis doctoral:**

**Microextracción con disolventes supramoleculares para la  
determinación estereoselectiva de contaminantes  
emergentes quirales**

Trabajo presentado, para optar al grado de Doctor, por

Ana Belén Lara Fuentes

que lo firma en Córdoba, 2 de junio de 2020

Firmado:

Ana Belén Lara Fuentes

Licenciada en Química

Con el VºBº de las directoras,

Mª Dolores Sicilia Criado y Mª Carmen Caballo Linares

Firmado:

Dra. María Dolores Sicilia Criado

Catedrática del Departamento de Química  
Analítica de la Universidad de Córdoba

Firmado:

Dra. María del Carmen Caballo Linares



María Dolores Sicilia Criado, catedrática del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba y María del Carmen Caballo Linares, doctora en Química, en calidad de directoras de la Tesis Doctoral presentada por la licenciada en Química, Ana Belén Lara Fuentes,

CERTIFICAN: Que la citada Tesis Doctoral “Microextracción con disolventes supramoleculares para la determinación estereoselectiva de contaminantes emergentes quirales” se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba y que, a nuestro juicio, reúne todos los requisitos exigidos a este tipo de trabajos.

Y para que conste y surta los efectos pertinentes, expide el presente certificado en Córdoba a 2 de junio de 2020.

Firmado:

Dra. María Dolores Sicilia Criado

Catedrática del Departamento de Química  
Analítica de la Universidad de Córdoba

Firmado:

Dra. María del Carmen Caballo Linares



**TÍTULO DE LA TESIS:**

Microextracción con disolventes supramoleculares para la determinación estereoselectiva de contaminantes emergentes quirales

**DOCTORANDA:** Ana Belén Lara Fuentes

**INFORME RAZONADO DE LAS DIRECTORAS DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Los trabajos de investigación realizados en esta Tesis doctoral han tenido como principal objetivo evaluar el uso de disolventes supramoleculares en combinación con cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas para el desarrollo de métodos estereoselectivos que cumplan los requisitos de exactitud, precisión, sensibilidad, rapidez y coste para su aplicación en análisis medioambiental y de alimentos. Los estudios llevados a cabo han permitido avanzar de forma significativa en el ámbito del análisis quiral de contaminantes emergentes, un campo muy poco desarrollado, a pesar del reconocimiento de la comunidad científica de la importancia de estudiar el impacto medioambiental y controlar la presencia en alimentos de los estereoisómeros de los contaminantes quirales de forma separada debido a su diferente toxicidad, biodegradabilidad, metabolización y persistencia. También se han realizado avances de interés en otros ámbitos de la Química Analítica, como la propuesta de disolventes supramoleculares con capacidad para formar puentes de halógeno para aumentar la eficacia de extracción de compuestos halogenados en diferentes tipos de muestras, o el uso de disolventes supramoleculares volátiles para ampliar el campo de aplicación de la extracción supramolecular en combinación con la cromatografía líquida quiral.

Las excelentes prestaciones de los disolventes supramoleculares usados para extraer los contaminantes en cuanto a eficacia de extracción y limpieza de los extractos, junto con la elevada selectividad y sensibilidad proporcionada por la cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas, ha permitido desarrollar métodos simples, que reducen el

consumo de reactivos y disolventes y, por tanto, la generación de residuos, con respecto a los métodos previamente propuestos. Los métodos desarrollados han sido sometidos a una validación intralaboratorio exhaustiva y su aplicabilidad ha sido demostrada mediante el análisis de una amplia variedad de muestras medioambientales (suelos, sedimentos, aguas naturales y material biológico) y productos agrícolas (frutas y verduras).

Los resultados más relevantes de las investigaciones llevadas a cabo se han publicado en 4 artículos científicos (3 publicados en revistas científicas indexadas situadas en el primer cuartil y 1 enviado a publicación). Asimismo, la doctoranda ha presentado nueve contribuciones a congresos (7 nacionales y 2 internacionales), 4 de ellas comunicaciones orales.

Dada la originalidad y extensión del trabajo realizado por Dña. Ana Belén Lara Fuentes y su formación en tareas de investigación, autorizamos la presentación de su Tesis Doctoral.

Córdoba a 2 de junio de 2020

Firma de las directoras

Firmado:

Dra. María Dolores Sicilia Criado

Catedrática del Departamento de Química  
Analítica de la Universidad de Córdoba

Firmado:

Dra. María del Carmen Caballo Linares

**INFORME DEL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES DE LA TESIS.****TÍTULO DE TESIS: MICROEXTRACCIÓN CON DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES PARA LA DETERMINACIÓN ESTEREOSELECTIVA DE CONTAMINANTES EMERGENTES QUIRALES.****DOCTORANDO/A: ANA BELÉN LARA FUENTES.**

<b>PUBLICACION</b>	<b>FACTOR DE IMPACTO</b> (JCR del año de publicación)	<b>CUARTIL</b> (Lugar que ocupa/Nº de revistas del Área temática)
Enantiomer-specific determination of hexabromocyclododecane in fish by supramolecular solvent-based single-step sample treatment and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 752 (2012) 62-68.	4,385	1º (7/75) Cat. Analytical Chemistry
Speeding up the extraction of hexabromocyclododecane enantiomers in soils and sediments based on halogen bonding. Analytica Chimica Acta 1027 (2018) 47-56.	5,256	1º (10/84) Cat. Analytical Chemistry
Halogen bonding for increasing efficiency in liquid-liquid microextraction: Application to the extraction of hexabromocyclododecane enantiomers in river waters. Journal of Chromatography A 1600 (2019) 95-104.	3,858	1º (15/84) Cat. Analytical Chemistry
Quick and sensitive enantioselective determination of permethrin in fruits and vegetables by combining supramolecular solvents and chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry (2020). Enviado para su publicación	3,571	1º (28/135) Cat. Food Science & Technology





## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directoras de tesis Lola y Carmen y al grupo FQM 186 por permitirme hacer el doctorado en Química Analítica que siempre fue uno de mis sueños, y por iniciarme y enseñarme lo que es el mundo de la investigación.

A mi familia todo su apoyo tanto sentimental como económico, que como dice Shakira “quien aguanta más a uno que la familia” . Por vuestra comprensión y aguante durante todos estos años. Siempre habéis estado ahí tanto en los buenos momentos como en los malos. Sin vosotros esta tesis no hubiera sido posible.

A mi perrita Wendy que hasta su último día siempre me ha acompañado a todas partes, incluyendo todos los fines de semana que he pasado en el laboratorio del grupo acabando el experimental.

A mis amigas/o de Córdoba, Sara, Ángela, Marisa, María Luisa, David, Elisabet, Rocío y María por haber estado junto a mí desde que nos conocimos en la carrera, por todos los buenos momentos que hemos disfrutado juntos, por su apoyo en mis momentos de bajón, por siempre escucharme, por ayudarme a ver el lado positivo de las cosas, por sus conocimientos y por sus consejos. Él y ellas también son un pilar fundamental en mi vida.

A mis amigas/os de Sevilla, Ángela y Curro, por acogerme dentro de sus familias y ser una más todo el tiempo que he estado en Sevilla, por su ayuda y por aquellos fines de semana que se han venido conmigo a la universidad. A Cristina y Miquel por su apoyo y optimismo.

A mis compañeros que he conocido en el departamento destacando Eli, Jamal, Guille, Ana, Sandra, Vanesa, Marina, Angelina, Noelia, Francisco, Carmen y Auxi gracias por los momentos vividos, por siempre tener una sonrisa y palabras amables, por enseñarme sus diferentes formas de ver la vida. Y especialmente gracias a Noelia por enseñarme todo lo que sabe. Ella me enseñó todo sobre espectrometría de masas, cómo funcionan los equipos, como repararlos y, gracias a ella tuve mi primer empleo como licenciada en química fuera de la Universidad.

A los profesores Marisol, Lourdes y Miguel por su apoyo y palabras de cariño muy necesarias, ellas quizás no se acuerden pero yo las tengo grabadas en mi memoria. A Arturo por escucharme, por su tiempo y sus sabios consejos.

Y gracias al tribunal por aceptar formar parte de esta tesis, y porque con ellos se pone punto y final a esta etapa.

Muchas gracias a todos los que siempre me habéis dado ánimo y fuerza para seguir, para superarme y para que siga mis objetivos hasta el final.

¡MUCHAS GRACIAS!

# ÍNDICE



Resumen/Abstract .....	1
Objeto .....	7
Contenido .....	11
Introducción .....	17
1. Compuestos quirales .....	19
1.1. Estereoquímica de los compuestos quirales.....	19
1.2. Compuestos quirales en el medioambiente y los alimentos .....	22
1.3. Análisis estereoselectivo de muestras medioambientales y de alimentos .....	23
2. Hexabromociclododecano .....	25
2.1. Propiedades fisicoquímicas .....	25
2.2. Contaminación medioambiental .....	27
2.3. Procesos de degradación y metabolización estereoselectiva.....	28
2.4. Toxicidad estereoselectiva.....	29
2.5. Análisis estereoselectivo .....	30
2.5.1. Tratamiento de muestras medioambientales .....	30
2.5.2. Separación y detección .....	31
3. Piretroides .....	33
3.1. Propiedades fisicoquímicas.....	34
3.2. Residuos de piretroides en alimentos. Legislación europea.....	36
3.3. Toxicidad estereoselectiva .....	37
3.4. Análisis estereoselectivo.....	38
3.4.1. Tratamiento de muestras de alimentos .....	39
3.4.2. Separación y detección.....	39
4. Disolventes supramoleculares.....	41
4.1. Síntesis .....	41
4.1.1. Proceso de autoensamblaje y coacervación .....	41
4.1.2. Factores inductores de la coacervación .....	43
4.2. Volumen y composición .....	48
4.3. Nanoestructura.....	53
4.4. Capacidad de solubilización .....	54

4.5. Aplicaciones en procesos de extracción.....	55
Parte experimental	
Microextracción supramolecular en análisis quiral medioambiental y de alimentos .....	75
Capítulo 1. Análisis quiral de muestras medioambientales .....	77
Speeding up the extraction of hexabromocyclododecane enantiomers in soils and sediments based on halogen bonding .....	79
Halogen bonding for increasing efficiency in liquid-liquid microextraction: Application to the extraction of hexabromocyclododecane enantiomers in river waters .....	105
Enantiomer-specific determination of hexabromocyclododecane in fish by supramolecular solvent-based single-step sample treatment and liquid chromatography-tandem mass spectrometry .....	131
Capítulo 2. Análisis quiral de productos agrícolas.....	151
Quick and sensitive enantioselective determination of permethrin in fruits and vegetables by combining supramolecular solvents and chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry .....	153
Conclusiones .....	155
Apéndice A: Publicaciones científicas derivadas de la Tesis .....	161
Apéndice B: Contribuciones a congresos .....	165

## **RESUMEN/ABSTRACT**





## RESUMEN

Los contaminantes emergentes son sustancias químicas de origen antropogénico recientemente detectadas en el medio ambiente y los alimentos debido a su uso en la industria, la agricultura, la ganadería, etc. Un importante número de contaminantes emergentes son quirales, es decir, presentan diferentes formas estereoisoméricas que generalmente difieren en toxicidad y persistencia en el medio ambiente. Por lo tanto, para realizar una correcta evaluación de los riesgos medioambientales y para la salud humana de estos contaminantes es fundamental monitorizar cada uno de sus estereoisómeros individualmente, para lo que se requieren métodos analíticos adecuados. Los métodos disponibles para la determinación estereoselectiva de contaminantes emergentes son, en el mejor de los casos, escasos y laboriosos y, en muchas ocasiones, inexistentes.

El objetivo de esta Tesis ha sido desarrollar nuevos métodos para la determinación estereoselectiva de contaminantes emergentes en muestras medioambientales y de alimentos basados en extracción con disolventes supramoleculares (supramolecular solvent, SUPRAS) y cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas en tándem (CLQ-MS/MS). Los SUPRAS, líquidos nanoestructurados constituidos por agregados de compuestos anfífilos, presentan características que los hacen especialmente adecuados para su uso en procesos de extracción, entre las que cabe destacar la facilidad para obtener disolventes con diferentes funcionalidades mediante procesos de síntesis simples y su elevada eficacia de extracción. La CLQ-MS/MS permite separar, identificar y cuantificar estereoisómeros con elevada sensibilidad.

Las investigaciones llevadas a cabo en esta Tesis han permitido desarrollar métodos simples, rápidos y fiables para la determinación estereoselectiva de contaminantes halogenados (estereoisómeros del hexabromociclododecano) en una amplia variedad de muestras medioambientales (suelos, sedimentos, peces y fracción disuelta y particulada de aguas de río) y de residuos de plaguicidas (estereoisómeros de la permetrina) en frutas y verduras. Los SUPRAS usados en los procesos de extracción, disolventes constituidos por agregados inversos de ácido decanoico o hexanol, proporcionan rendimientos de extracción próximos al 100% usando bajas relaciones de volumen de SUPRAS a volumen de muestra líquida o peso de muestra sólida ( $1,4 \mu\text{L mL}^{-1}$ ,  $0,4\text{-}0,8 \mu\text{L mg}^{-1}$ ) y bajos tiempos de extracción (5-15 min). Además, proporcionan extractos lo suficientemente limpios para ser analizados directamente mediante CLQ-MS/MS, sin necesidad de realizar etapas adicionales de limpieza, necesarias

cuando se utilizan disolventes orgánicos. Los métodos desarrollados basados en extracción con SUPRAS y CLQ-MS/MS son exactos, precisos, selectivos y sensibles, habiéndose demostrado su aplicabilidad para el análisis de una amplia variedad de muestras.

## ABSTRACT

Emerging pollutants are chemicals of anthropogenic origin recently detected in the environment and food because of their use in industry, agriculture, livestock, etc. A significant number of emerging pollutants are chiral, that is, they present different stereoisomeric forms that generally differ in toxicity and persistence in the environment. Therefore, to carry out a correct evaluation of the environmental and human health risks of these pollutants, it is essential to monitor each of their stereoisomers individually, for which adequate analytical methods are required. The available methods for the stereoselective determination of emerging pollutants are, at best, scarce and laborious and, in many cases, non-existent.

The objective of this Thesis has been to develop new methods for the stereoselective determination of emerging contaminants in environmental and food samples based on extraction with supramolecular solvents (SUPRAS) and chiral liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (QLC-MS/MS). SUPRAS, nanostructured liquids made up of aggregates of amphiphilic compounds, have characteristics that make them especially suitable for use in extraction processes, including the ease of obtaining solvents with different functionalities through simple synthesis processes and their high efficiency extraction. QLC-MS/MS allows to separate, identify, and quantify stereoisomers with high sensitivity.

The investigations carried out in this Thesis have allowed to develop simple, fast and reliable methods for the stereoselective determination of halogenated contaminants (hexabromocyclododecane stereoisomers) in a wide variety of environmental samples (soils, sediments, fishes and dissolved and particulate fraction of river waters) and pesticide residues (permethrin stereoisomers) in fruits and vegetables. SUPRAS used in extraction processes, solvents consisting of reverse aggregates of decanoic acid or hexanol, provide extraction yields near 100% using low ratios of SUPRAS volume to liquid sample volume or solid sample weight ( $1.4 \mu\text{L mL}^{-1}$ ,  $0.4\text{-}0.8 \mu\text{L mg}^{-1}$ ) and low extraction times (5-15 min). In addition, they provide extracts that are clean enough to be analysed directly by QLC-MS/MS, without the need for additional clean-up, necessary when organic solvents are used. The methods developed based on extraction with SUPRAS and QLC-MS/MS are accurate, precise, selective, and sensitive, having proved their applicability to the analysis of a wide variety of samples.



## **OBJETO**



Los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y el medioambiente [Organización Mundial de la Salud (OMS), Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA), Comisión Europea (EC), etc.] cuentan entre sus líneas de investigación prioritarias con estudios sobre persistencia, bioacumulación y toxicidad de contaminantes emergentes. Muchos de estos contaminantes no están regulados, pero debido a su extendido uso, pueden ser regulados en el futuro una vez recabados datos en campañas de monitorización medioambiental y de alimentos y realizados estudios sobre sus efectos en el medioambiente y la salud humana. Un importante número de contaminantes emergentes son quirales, es decir, presentan diferentes formas estereoisoméricas que generalmente difieren en toxicidad y persistencia en el medio ambiente, por lo que para realizar una correcta evaluación de los riesgos medioambientales y para la salud humana de estos contaminantes, es fundamental monitorizar cada uno de sus estereoisómeros individualmente, para lo que se debe disponer de métodos analíticos adecuados. Los métodos disponibles para la determinación estereoselectiva de contaminantes emergentes son, en el mejor de los casos, escasos y laboriosos y, en muchas ocasiones inexistentes, por lo que es fundamental desarrollar nuevos métodos analíticos que permitan analizar un elevado número de muestras de forma fiable, simple, rápida y con bajo coste.

Esta Tesis ha tenido como principal objetivo el desarrollo de nuevos métodos para la determinación estereoselectiva de contaminantes emergentes en muestras medioambientales y de alimentos basados en extracción con disolventes supramoleculares (supramolecular solvent, SUPRAS) y cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas. Se combinan ambas técnicas para obtener la sensibilidad y selectividad requeridas para la determinación de contaminantes emergentes a baja concentración en matrices complejas: aguas naturales, suelos, sedimentos y material biológico. Entre las características más destacables de la cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas se encuentra su capacidad para separar estereoisómeros, sustancias con la misma fórmula química y las mismas uniones entre átomos pero con diferente estructura tridimensional, permitiendo su identificación y cuantificación a bajas concentraciones de forma selectiva. En cuanto al tratamiento de muestra, las características de los SUPRAS, líquidos nanoestructurados constituidos por agregados de compuestos anfífilos, los hacen especialmente adecuados para su uso en procesos de extracción. Entre estas características cabe destacar: 1) Su síntesis, basada en un proceso de coacervación, es muy simple y rápida, siendo posible obtener disolventes con diferente nanoestructura y funcionalidad seleccionando la estructura y concentración de las moléculas anfífilas que los constituyen y el medio en el que se produce su agregación. 2) Presentan una elevada eficacia de extracción de analitos en un amplio intervalo de polaridades debido a su capacidad para establecer



diferentes tipos de interacciones y al elevado número de centros de solubilización que poseen. 3) Permiten desarrollar procesos de extracción seguros para los analistas y respetuosos con el medio ambiente, ya que los SUPRAS no son inflamables y eliminan o minimizan el uso de disolventes orgánicos tóxicos.

Los objetivos concretos de esta Tesis Doctoral han sido:

- 1) Evaluar la capacidad de los SUPRAS para extraer contaminantes emergentes quirales de muestras medioambientales y de alimentos.
- 2) Desarrollar métodos de separación y determinación de enantiómeros de contaminantes emergentes quirales basados en cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas.
- 3) Determinar el grado de compatibilidad de los extractos supramoleculares con los métodos de separación y determinación y, en caso necesario, diseñar y desarrollar procedimientos de compatibilización.
- 4) Validar los métodos desarrollados para la determinación estereoselectiva de contaminantes emergentes en los diferentes tipos de muestras investigadas, determinando los parámetros de calidad de los métodos mediante estudios intralaboratorio.
- 5) Demostrar la aplicabilidad de los métodos desarrollados mediante el análisis de muestras de diferente composición y procedencia.

Por último, un objetivo fundamental durante la realización de la Tesis ha sido la formación de la doctoranda en tareas de investigación, para lo que ha realizado diferentes actividades directamente relacionadas con la labor investigadora entre las que se incluyen, además del diseño y realización de experimentos en el laboratorio, la redacción de artículos científicos, la asistencia y presentación de comunicaciones a congresos y la realización de cursos de especialización.

# **CONTENIDO**



En la Memoria de esta Tesis Doctoral se incluye un primer apartado de introducción donde se discuten los aspectos más importantes de los contaminantes emergentes quirales investigados (hexabromociclododecanos y piretroides), incidiendo en su comportamiento estereoselectivo en procesos bióticos (biodegradación, metabolización, toxicidad, etc.) y en los métodos desarrollados hasta el momento para su determinación estereoselectiva en muestras medioambientales y de alimentos. En este apartado también se describen las características más destacables de los disolventes supramoleculares usados en procesos de extracción y las principales aplicaciones desarrolladas hasta el momento para el tratamiento de muestras líquidas y sólidas usando estos disolventes. A continuación, se resumen los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas en esta Tesis para desarrollar métodos analíticos para la determinación de estereoisómeros de contaminantes emergentes en muestras medioambientales y de alimentos basados en microextracción con disolventes supramoleculares y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Los resultados obtenidos se han estructurado en dos capítulos:

## **Capítulo 1. Análisis quiral de muestras medioambientales**

En este capítulo se incluyen los estudios realizados para evaluar la capacidad de disolventes supramoleculares con capacidad para formar enlaces de halógeno para extraer contaminantes halogenados en distintos tipos de muestras medioambientales [aguas naturales (fracción líquida y particulada), suelos, sedimentos y peces] previa a su determinación estereoselectiva mediante cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). Los contaminantes halogenados estudiados fueron los estereoisómeros del hexabromociclododecano (HBCD), enantiómeros (+) y (-) de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ - HBCD. Estos compuestos forman parte de un aditivo industrial ampliamente usado como retardante de llama desde la prohibición en la Unión Europea en 2006 del uso de los bisfenilos y difenil éteres polibrominados.

Los disolventes supramoleculares investigados fueron disolventes constituidos por agregados hexagonales inversos de ácido decanoico (ADe), sintetizados adicionando  $H_2O$  a pH ácido (1-4) a suspensiones coloidales de micelas inversas de ADe en tetrahidrofurano (THF). Las proporciones de THF y  $H_2O$  usadas en la síntesis determinan la nanoestructura y composición del disolvente y, por tanto, su capacidad de extracción. Por otra parte, la nanoestructura del disolvente también determina su capacidad para actuar como material de acceso restringido, es decir, su capacidad para excluir macromoléculas presentes en las muestras (ácidos

húmicos, polisacáridos, proteínas), proporcionando extractos que pueden ser directamente inyectados en el cromatógrafo de líquidos sin necesidad de realizar etapas adicionales de limpieza. Una vez seleccionado el disolvente supramolecular usado para la extracción se estudió la influencia de diferentes variables experimentales en la eficacia de la extracción. En los estudios realizados sobre extracción de HBCD en suelos y sedimentos también se investigó el efecto en la eficacia de extracción obtenida del tiempo de contacto del contaminante con las partículas de suelo y sedimento y, en las investigaciones realizadas para desarrollar un método para la determinación de HBCD en la fracción líquida y particulada de aguas naturales, se estudió la viabilidad de los procedimientos propuestos hasta el momento para separar ambas fracciones basados en filtración y se desarrolló un método alternativo de separación basado en centrifugación.

En cuanto a la determinación estereoselectiva del HBCD, se demostró que el uso de disolventes de ADe era compatible con la separación de los estereoisómeros del HBCD en una fase estacionaria de  $\beta$ -ciclodextrina y su detección mediante espectrometría de masas en tándem con su ionización en una fuente de electrospray en modo negativo. Para cada una de las muestras investigadas, se determinó el método de calibración más adecuado para corregir los efectos matriz y se establecieron los parámetros de calidad del método desarrollado basado en extracción supramolecular y LC-MS/MS. Finalmente, los métodos propuestos se usaron para determinar los estereoisómeros del HBCD en una amplia variedad de muestras medioambientales líquidas y sólidas a concentraciones del orden de los  $\text{ng L}^{-1}$  y  $\text{ng g}^{-1}$ , respectivamente.

## Capítulo 2. Análisis quiral de productos agrícolas

Las investigaciones descritas en este capítulo se han centrado en el desarrollo del primer método estereoselectivo para la determinación de residuos de insecticidas del grupo de los piretroides en frutas y verduras. Los piretroides sintéticos comenzaron a usarse como insecticidas en los años 50, pero ha sido recientemente cuando se ha extendido su uso debido a las restricciones impuestas a la utilización en agricultura de otros insecticidas, como los plaguicidas organoclorados. Los estudios se han centrado en la permetrina, un piretroide sintético de primera generación ampliamente usado fuera de Europa para proteger cultivos de frutas y verduras de las plagas de insectos. En Europa su uso está prohibido debido a su toxicidad, pero se encuentra con frecuencia en productos importados.

El método desarrollado permite determinar los cuatro estereoisómeros de la permetrina, los enantiómeros S y R de los isómeros cis y trans, mediante su extracción con un disolvente supramolecular volátil constituido por agregados hexagonales inversos de hexanol y la inyección de los extractos en el cromatógrafo de líquidos una vez eliminado el disolvente supramolecular y redisolutos los analitos en metanol. El carácter volátil del disolvente permite compatibilizar la extracción de los analitos en un disolvente supramolecular con su determinación estereoselectiva mediante cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas en tándem.

Los estudios realizados para desarrollar este método incluyen el establecimiento de las condiciones experimentales para la separación de los cuatro estereoisómeros de la permetrina en una fase estacionaria de  $\beta$ -ciclodextrina y su detección mediante espectrometría de masas usando una fuente de electrospray para su ionización en modo positivo como aductos de amonio. También se investigó la compatibilidad de diferentes disolventes supramoleculares con propiedades de acceso restringido constituidos por alcoholes con longitud de cadena comprendida entre 6 y 12 átomos de carbono con la determinación cromatográfica de los analitos. Una vez seleccionado el disolvente de hexanol como extractante, se optimizó el proceso de extracción estudiando el efecto de diferentes variables experimentales en la eficacia del proceso de extracción y en la limpieza de los extractos, realizando estudios para evaluar el efecto matriz en distintos tipos de frutas (manzana, naranja y melón) y verduras (pimiento verde, tomate, judías verdes y col) y seleccionar el método de calibración más adecuado en cada caso.

El método desarrollado para determinar los estereoisómeros de la permetrina en frutas y verduras se caracterizó evaluando sus propiedades analíticas y se aplicó al análisis de muestras adicionadas con concentraciones de (R)-cis-, (S)-cis-, (R)-trans- y (S)-trans-permetrina del orden de los  $\text{ng g}^{-1}$ .

En la memoria también se incluye un apartado dedicado a exponer las principales conclusiones obtenidas en los trabajos de investigación desarrollados y dos apéndices. En el apéndice A se enumeran los artículos científicos publicados en las revistas internacionales especializadas a los que ha dado lugar esta Tesis Doctoral y en el apéndice B las comunicaciones orales y tipo póster presentadas en congresos nacionales e internacionales.



# **INTRODUCCIÓN**

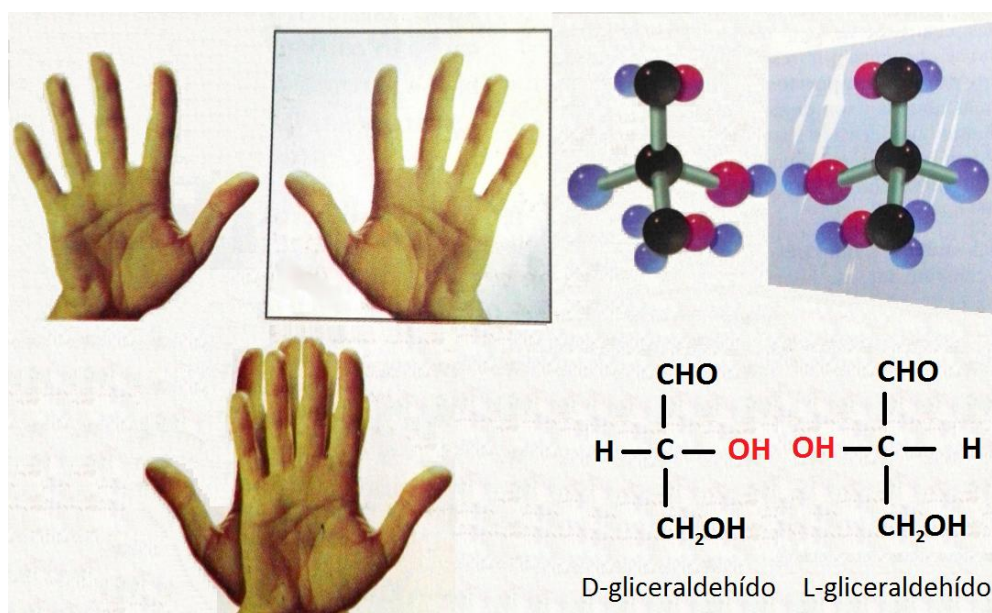




# 1. COMPUESTOS QUIRALES

## 1.1. ESTEREOQUÍMICA DE LOS COMPUESTOS QUIRALES

Existen numerosos compuestos naturales y sintéticos que presentan quiralidad. De acuerdo con la definición clásica de quiralidad, los compuestos quirales se caracterizan por presentar uno o más carbonos asimétricos, es decir, carbonos que tienen los cuatro sustituyentes diferentes. Estos carbonos asimétricos se denominan centros quirales (del griego *chiro*, mano). Por cada carbono asimétrico, la molécula quiral presenta 2 estereoisómeros, de forma que para  $n$  carbonos asimétricos, la molécula quiral presenta  $2^n$  estereoisómeros. Los estereoisómeros pueden ser enantiómeros y diastereoisómeros. Los enantiómeros se caracterizan por ser imágenes especulares no superponibles y presentar las mismas propiedades fisicoquímicas, a excepción de la dirección en que hacen girar la luz polarizada cuando esta incide sobre ellos y en cómo interaccionan con otros compuestos quirales. Los diastereoisómeros o diastereómeros son estereoisómeros que no son imágenes especulares unos de otros y presentan propiedades fisicoquímicas diferentes. La Figura 1.1 muestra un ejemplo de enantiómeros.

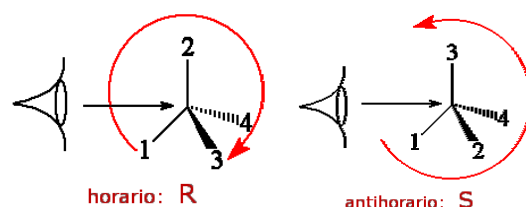


**Figura 1.1.** Formas enantioméricas del D, L glicerandehído, compuestos no superponibles de forma similar a las palmas de las manos.

Por otra parte, elementos como el azufre, nitrógeno, fósforo y boro también pueden dar lugar a centros quirales estables y algunas moléculas con átomos con impedimento de libre rotación también presentan quiralidad. Por último, también se producen otros tipos de quiralidad no relacionados con la presencia de centros quirales, como la quiralidad axial (molécula sin planos de simetría). De forma general se puede afirmar que, una molécula quiral es aquella que no posee ninguno de los siguientes elementos de simetría: plano de simetría (plano de reflexión a través del que se obtiene una copia idéntica a la molécula original), centro de inversión (punto que invierte todos los átomos de la molécula dejándola en una configuración indistinguible de la original) y eje de rotación impropio (rotación alrededor de un eje seguida por una reflexión en un plano perpendicular a ese eje que da lugar a la molécula original).

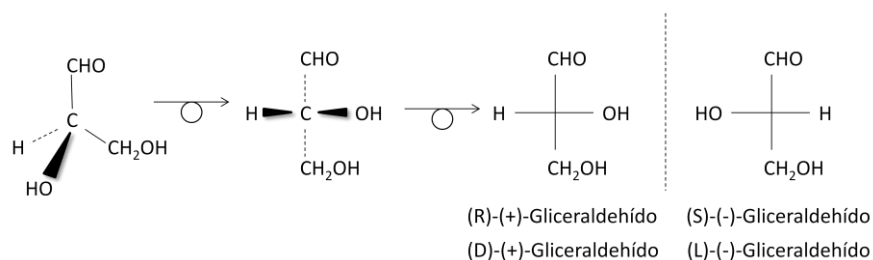
Son varios los sistemas usados para nombrar enantiómeros:<sup>1,2</sup>

- **Sistema de nomenclatura R, S.** El sistema, R, S, fue desarrollado por los químicos R. S. Cahn, C. Ingold y V. Prelog y consiste en disponer los cuatro sustituyentes del carbono asimétrico dentro de un tetraedro y ordenarlos en orden decreciente de prioridad. La prioridad se establece en función del número atómico de los átomos unidos al centro estereogénico, el primero es el de mayor número atómico y el último es el de menor número atómico. Una vez establecida la prioridad, se sitúa el grupo de más bajo peso atómico lo más lejos posible del observador y se describe un círculo de acuerdo a la prioridad del resto de grupos. El carbono tiene configuración R (*rectus* que en latín significa derecha) si el círculo que se describe va en sentido de la agujas del reloj, y es S (*sinister* que en latín significa izquierda) si van en el sentido contrario. La ordenación de los grupos unidos a un carbono asimétrico se denomina configuración absoluta.



**Figura 1.2.** Configuración espacial R y S de los sustituyentes de un carbono asimétrico.

- **Sistema de nomenclatura D, L.** Este sistema de nomenclatura fue desarrollado a finales del siglo XIX por Emil Fischer, científico que desarrolló un sistema para representar las estructuras tridimensionales de los hidratos de carbono como bidimensionales. En estas representaciones denominadas proyecciones de Fischer, los enlaces de los cuatro sustituyentes con el carbono asimétrico se representan en forma de cruz. Las líneas horizontales representan los enlaces dirigidos hacia el observador y las líneas verticales los enlaces dirigidos en dirección contraria. El enantiómero D es el azúcar en el que el grupo hidroxilo del penúltimo carbono se sitúa a la derecha, y el L en el que lo sitúa a la izquierda. Esta configuración se extendió al resto de compuestos quirales.



**Figura 1.3.** Proyección de Fischer del D- y L- Gliceraldehído.

Los enantiómeros D y L equivalen a los enantiómeros R y S respectivamente, por lo tanto, al igual que el sistema de nomenclatura R, S, indican la configuración del carbono quiral.

- **Sistema de nomenclatura dextrógiro (+), levógiro (-).** Los enantiómeros son moléculas ópticamente activas que rotan el plano de la luz polarizada debido a la interacción del haz de luz con los electrones del enantiómero. El enantiómero que gira el plano de luz en el sentido de las agujas del reloj es dextrógiro (el prefijo *dexter* en latín significa derecha) y el símbolo usado para designarlo es d o (+) y el enantiómero que gira el plano de luz en la misma medida pero en sentido contrario a las agujas del reloj es levógiro (el prefijo *laevus* en latín significa izquierda) y se designa con el símbolo l o (-). Por su capacidad para girar el plano de la luz polarizada, a los enantiómeros también se les denomina isómeros ópticos.

Los estudios de rotación óptica por si solos no proporcionan información de la configuración absoluta, es decir, no es posible saber a priori si el enantiómero R o S

es el que se corresponde con el enantiómero (+) o (-), sino que es necesario recurrir a otras técnicas como estudios de difracción rayos X para obtener esta información.

## 1.2. COMPUESTOS QUIRALES EN EL MEDIOAMBIENTE Y LOS ALIMENTOS

En la actualidad se utiliza un elevado número de compuestos quirales con diferentes fines: Aditivos industriales (ej. hexabromociclododecano usado como retardante de llama), insecticidas (ej. piretroides), herbicidas (ej. fenoxiácidos), fármacos (ej. profenos), etc. Generalmente se comercializan como mezclas racémicas debido a la complejidad y el elevado coste de la producción de enantiómeros puros, aunque en los últimos años se ha producido un importante aumento del número de compuestos enantioméricamente puros comercializados, ya que son más eficaces que las mezclas racémicas.<sup>3</sup> El uso de enantiómeros puros es más frecuente en fármacos debido a los efectos secundarios que producen determinados enantiómeros (ej. S-Talidomida).

Debido a su extendido uso, los compuestos quirales se encuentran con frecuencia como contaminantes en el medio ambiente y su uso en agricultura (plaguicidas) y en explotaciones ganaderas (fármacos de uso veterinario), hace que también se encuentren frecuentemente en los alimentos.

Los enantiómeros de un compuesto quiral poseen las mismas características fisicoquímicas y, por lo tanto, presentan el mismo comportamiento en procesos abióticos (fotólisis, hidrólisis, adsorción, volatilización, etc.), pero su comportamiento en procesos bióticos (biodegradación, metabolización, etc.) generalmente es muy distinto. Los enantiómeros interaccionan de forma diferente con enzimas y receptores biológicos dando lugar a procesos de biodegradación y metabolización enantioselectivos y procesos de interconversión de un enantiómero en otro, lo que origina cambios en su relación enantiomérica (RE) o fracción enantiomérica (FE) con respecto a la existente antes de sufrir el proceso biótico. La RE se define como el cociente entre las concentraciones molares de los dos enantiómeros del compuesto quiral ( $[\text{enantiómero 1}]/[\text{enantiómero 2}]$ ) y la FE como el cociente entre la concentración molar de uno de los enantiómeros y la concentración total del compuesto quiral ( $[\text{enantiómero 1}]/([\text{enantiómero 1}]+[\text{enantiómero 2}])$ ). La enantioselectividad de las interacciones con los receptores biológicos también son las responsables de que los enantiómeros presenten diferente toxicidad, carcinogenicidad o mutagenicidad. Por lo tanto, dado el comportamiento diferencial de los enantiómeros, para evaluar correctamente los riesgos medioambientales y para la salud humana de los compuestos quirales es fundamental evaluar el riesgo asociado a cada uno de los enantiómeros independientemente.

### 1.3. ANÁLISIS ESTEREOSELECTIVO DE MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES Y DE ALIMENTOS

El número de métodos analíticos disponibles para la determinación de los estereoisómeros de un compuesto quiral en muestras complejas, como es el caso de las muestras medioambientales y de alimentos, es escaso debido a las dificultades que implica el análisis quiral de este tipo de muestras. Se requiere determinar de forma independiente compuestos con estructuras químicas prácticamente idénticas, con la única diferencia de la distinta disposición espacial de los enlaces entre átomos. Además, la determinación se debe realizar en muestras con innumerables posibles especies interferentes y baja concentración de los analitos, con frecuencia del orden de los  $\text{ng L}^{-1}$  y  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en muestras líquidas y sólidas, respectivamente.

El análisis quiral de muestras medioambientales y alimentos implica la extracción de los analitos de las muestras, generalmente usando extracción líquido-líquido o en fase sólida en muestras líquidas y extracción Soxhlet, con líquidos presurizados o asistida por ultrasonidos o microondas en muestras sólidas. Los extractos de muestras líquidas se someten con frecuencia a un segundo proceso de extracción en fase sólida para eliminar sustancias húmicas, y en general, es necesario concentrar los extractos mediante la evaporación del disolvente para alcanzar los bajos límites de cuantificación requeridos. Los extractos de muestras sólidas se someten a reextracción líquido-líquido, cromatografía de exclusión por tamaños y/o extracción en fase sólida para eliminar especies interferentes antes de concentrarlas mediante evaporación del disolvente. La determinación de los estereoisómeros en los extractos generalmente se realiza usando cromatografía de gases o de líquidos quiral acoplada a espectrometría de masas y la separación de los analitos con frecuencia se basa en su interacción con una fase estacionaria quiral. Para que dos enantiómeros se resuelvan es necesario que se produzcan un mínimo de tres enlaces a través de diferentes grupos entre la fase estacionaria quiral y el analito, siendo al menos una de ellos estereoquímicamente dependiente.

En la actualidad se dispone de más de 100 fases estacionarias quirales comercializadas. En la Tabla 1.1 se muestran algunas de las más usadas.

**Tabla 1.1.** Fases estacionarias quirales usadas en técnicas cromatográficas

Clasificación	Mecanismo de retención	Características del analito	Fase móvil
<i>Pirkle</i>	Formación de puentes de hidrógeno e interacciones $\pi$ - $\pi$ y polares.	Capacidad de formación de los enlaces indicados.	RP NP,
<i>Polisacáridos</i>	Formación de complejos de inclusión.	Capacidad de formación de puentes de hidrógeno	RP, NP
<i>Ciclodextrinas y éteres corona</i>	Formación de complejos de inclusión.	Grupos aromáticos y polares.	RP, NP
<i>Intercambio de ligandos</i>	Intercambio de ligandos con complejos metálicos.	$\alpha$ -amino o $\alpha$ -hidroxiaminoácidos	RP
<i>Proteínas</i>	Interacciones de dispersión y polares.	Grupos ionizables, grupos aromáticos.	RP
<i>Antibióticos macrocíclicos</i>	Formación de puentes de hidrógeno, interacciones polares, $\pi$ - $\pi$ y de dispersión e impedimentos estéricos.	Capacidad de formación de los enlaces indicados.	RP, NP
<i>Polímeros de impresión molecular</i>	Enlaces llave-cerradura.	Compuesto para el que ha sido diseñado.	NP

NP: Normal Phase= Fase normal

RP: Reverse Phase= Fase inversa

## 2. HEXABROMOCICLODODECANO

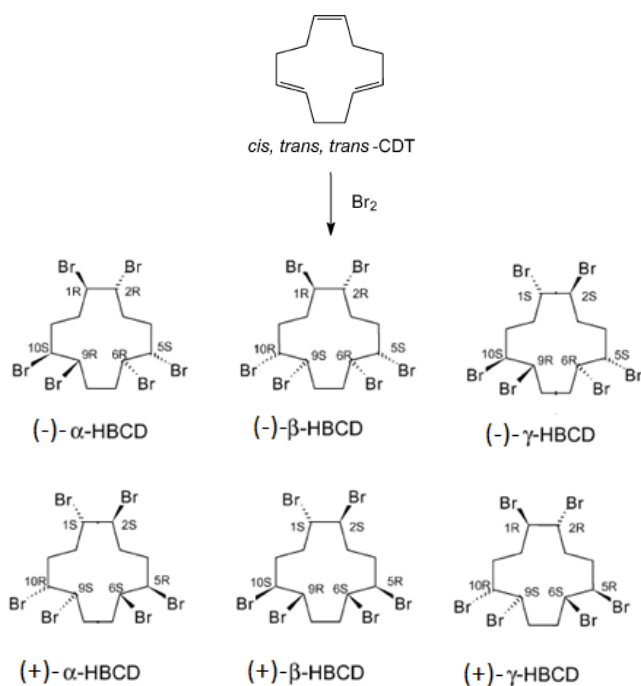
El hexabromociclododecano (HBCD) es un aditivo industrial del grupo de los retardantes de llama bromados (Brominated flame retardants, BFRs), grupo en el que también se incluyen los difenil éter polibromados (Polibrominated diphenyl eters, PBDEs) y bifenilos polibromados (Polibrominated biphenyls, PBBs). El HBCD es uno de los BFRs más utilizado a escala mundial, siendo el más usado en la fabricación de poliestireno expandido (expanded polystyrene, EPS) y extruido (extruded polystyrene, XPS), materiales ampliamente utilizados como aislante térmico en la construcción de edificios. También se utiliza en tapicerías, cortinas y carcasas de aparatos eléctricos. Su producción se ha visto incrementada en los últimos años debido a que en determinados países como Estados Unidos es el único retardante de llama cuyo uso está permitido y en otros, como los países de la Unión Europea, se ha prohibido el uso de otros BFRs como los PBDEs y PBBs. Se estima que la demanda del mercado mundial para el HBCD fue de 17 kilotoneladas en 2001,<sup>4</sup> la mayor parte consumidas en Europa (57%) y Asia (23%). Esta cantidad ha ido aumentando hasta las 28 kilotoneladas en 2011.<sup>5</sup>

Este compuesto se ha detectado en muestras medioambientales y en la biota de Europa, Norte América y Asia cerca de puntos de producción (ej. fabricas textiles y dedicadas a la producción de polímeros y vertederos de materiales de construcción) y también en el aire de zonas remotas de Suecia,<sup>6</sup> Finlandia y el Ártico,<sup>7,8</sup> lo que sugiere que este contaminante puede ser transportado a largas distancias a través de la atmósfera.

### 2.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

El HBCD se sintetiza mediante la bromación de los dobles enlaces del (1Z,5E,9E)-ciclododeca-1,5,9-trieno (cis,trans,trans-CDT), trímero del butadieno. El producto de esta síntesis es una mezcla técnica de estereoisómeros<sup>9</sup> en la que los componentes mayoritarios son los enantiómeros de 3 isómeros ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) en mezcla racémica, siendo el isómero  $\gamma$  el más abundante (75-89%), seguido de los isómeros  $\alpha$  (10-13%) y  $\beta$  (0,5-12%).<sup>10</sup> En la Figura 2.1 se muestra la reacción usada para la síntesis del HBCD y la estructura química de los seis estereoisómeros más abundantes en la mezcla técnica. Se trata de una estructura cíclica de doce átomos de carbono, seis de ellos unidos a seis átomos de bromo. La fórmula molecular del HBCD es  $C_{12}H_{18}Br_6$  y su peso molecular  $641,8 \text{ g mol}^{-1}$ .<sup>11</sup>





**Figura 2.1.** Síntesis del HBCD con a la formación de seis estereoisómeros mayoritarios.

El HBCD es sólido a temperatura ambiente, tiene un punto de fusión que varía entre 178 y 183 °C dependiendo de su composición, su punto de ebullición es de aproximadamente 230 °C y su presión de vapor  $6,3 \times 10^{-5}$  Pa a 21°C. Los isómeros poseen diferente estabilidad térmica, produciéndose la interconversión de isómeros a temperaturas superiores a 160 °C. El isómero  $\gamma$  se interconvierte en el isómero  $\alpha$  que es el más estable. El HBCD es una sustancia apolar, el valor de  $\log K_{OW}$  para la mezcla técnica es 5,6 y su solubilidad en agua  $65,6 \mu\text{g L}^{-1}$  a 20 °C.<sup>11</sup> En la Tabla 2.1 se muestran los valores de  $\log K_{OW}$  y solubilidad en agua para los isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ .

**Tabla 2.1.** Propiedades fisicoquímicas de los isómeros del HBCD.<sup>11</sup>

Isómero	$\log K_{OW}$	Solubilidad ( $\mu\text{g/L}$ ) a 20°C
$\alpha$ - HBCD	$5,07 \pm 0,09$	$48,8 \pm 1,9$
$\beta$ - HBCD	$5,12 \pm 0,09$	$14,7 \pm 0,5$
$\gamma$ - HBCD	$5,47 \pm 0,09$	$2,1 \pm 0,2$

## 2.2. CONTAMINACIÓN MEDIOAMBIENTAL

El HBCD es un contaminante emergente quiral considerado de gran interés por su persistencia en el medio ambiente, propiedades bioacumulativas y por ser neurotóxico, carcinogénico y disruptor endocrino. Su emisión al medio ambiente se produce fundamentalmente durante su síntesis y su uso en la fabricación del poliestireno expandido y extrudido, textiles y otros materiales, pero también durante la utilización de estos materiales, ya que el HBCD no se enlaza covalentemente al material. Por último, el HBCD también llega al medio ambiente a través de los vertederos que acumulan materiales desechados que lo contienen, durante la demolición de construcciones en las que se ha usado poliestireno como material aislante y en procesos de incineración de diferentes materiales.<sup>6,11</sup>

Las concentraciones más altas de HBCD se encuentran en suelos, sedimentos, aguas residuales y superficiales,<sup>12-15</sup> y biota<sup>14,16,17</sup> de las zonas cercanas a las industrias que lo sintetizan o utilizan.<sup>18</sup> Por ejemplo, la concentración de HBCD total encontrado en muestras de peces generalmente oscila entre 3 y 1.000 ng g<sup>-1</sup> lípidos,<sup>18</sup> pero en zonas cercanas a centros de fabricación se ha llegado a encontrar a concentraciones superiores a 10.000 ng g<sup>-1</sup> lípidos.<sup>19</sup> No obstante, como se ha comentado anteriormente, el HBCD puede ser transportado a largas distancias. De hecho, se ha llegado a detectar a 8.500 kilómetros del foco de emisión.<sup>20</sup> Determinados estudios indican que el HBCD podría experimentar un intercambio activo superficie-aire debido a fluctuaciones de la temperatura que se producen a lo largo del día y entre estaciones, lo que daría lugar al denominado “efecto saltamontes” que consiste en una serie de saltos causados por sucesivos procesos de deposición y volatilización del contaminante.<sup>11</sup> Se han observado diferencias en la transportabilidad de los distintos isómeros siendo el isómero  $\alpha$  el más fácilmente transportable seguido del  $\beta$  y el  $\gamma$ .<sup>11</sup>

El HBCD se adsorbe fuertemente sobre las partículas de suelos, sedimentos, lodos de depuradora y en partículas en suspensión en aguas naturales y residuales debido a su baja volatilidad y solubilidad en agua y a los fuertes enlaces que establece con la materia orgánica presente en estas partículas.<sup>21</sup> El uso de los lodos como fertilizante en agricultura también puede contribuir a la contaminación de las tierras agrícolas y, el HBCD presente en los diferentes medios abióticos, puede transferirse a la cadena trófica biocumulándose y alcanzando concentraciones relativamente altas en determinadas especies como aves, focas y los propios seres humanos.<sup>11,14,15</sup> Se han encontrado cantidades apreciables de HBCD en peces (<0,1 ng g<sup>-1</sup> de peso de lípidos->10  $\mu$ g g<sup>-1</sup>),<sup>14</sup> aire (0,011-1.070 ng m<sup>-3</sup>), aguas superficiales (0,011-4,88x 10<sup>4</sup> ng L<sup>-1</sup>), sedimentos (1,7-1.680 ng g<sup>-1</sup>) y suelos (140-1.300 ng g<sup>-1</sup>).

La amplia presencia del HBCD en diferentes compartimentos medioambientales de prácticamente todo el planeta junto con su persistencia, bioacumulatividad y toxicidad hacen que este contaminante sea motivo de preocupación a escala mundial. El 28 de octubre de 2008 el HBCD se añadió a la lista de la ECHA (European Chemicals Agency) de sustancias extremadamente preocupantes (Sustances of very high concern, SVHC)<sup>22,23</sup> y en el Convenio de Estocolmo (SC) celebrado el 9 de Mayo de 2013 se incluyó en la lista de Contaminantes Orgánicos Persistentes (POP).<sup>24</sup> También se ha incluido en el Sistema Integrado de Información de Riesgos (IRIS), y se está estudiando su inclusión en el programa "National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)" de biovigilancia humana de los EE.UU.<sup>23</sup> En junio de 2014, la EPA (Environmental Protection Agency) elaboró un informe de exposición y riesgos del HBCD y tiene la intención de iniciar diferentes acciones para proteger al medio ambiente y la salud humana de los efectos adversos de este contaminante.

### 2.3. PROCESOS DE DEGRADACIÓN Y METABOLIZACIÓN ESTEREOSELECCIONADA

El HBCD, al igual que otros contaminantes, sufre procesos de biodegradación y metabolización estereoselectivos en los que los distintos isómeros y enantiómeros pueden transformarse a diferentes velocidades originando cambios de composición en el medio ambiente y en los alimentos, con respecto a la encontrada en la mezcla técnica. En suelos y sedimentos, el perfil de los isómeros de HBCD es similar al de la mezcla comercial, siendo el isómero  $\gamma$  el más abundante. Sin embargo, en organismos vivos, este perfil cambia, siendo el isómero  $\alpha$  el más abundante,<sup>25,26</sup> debido a las diferentes tasas de absorción y metabolización de los isómeros<sup>27</sup> y a su bioisomerización con formación preferencial del isómero  $\alpha$ .<sup>28</sup> Se ha comprobado que el  $\alpha$ -HBCD es biológicamente más persistente que el  $\gamma$ -HBCD en ratones,<sup>29,30</sup> peces<sup>31</sup> y humanos,<sup>32</sup> ya que este último se elimina rápidamente del organismo.<sup>33</sup> Por otra parte, la transformación enantioselectiva de los enantiómeros (+) y (-) de los isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -HBCD puede producir cambios en su relación enantiomérica.<sup>34-37</sup> Así, por ejemplo, se ha observado un enriquecimiento del (-)- $\alpha$  HBCD en humanos,<sup>32</sup> ratas y peces.<sup>30</sup>

Existen pocos datos disponibles sobre la degradación del HBCD en agua, suelos, sedimentos y lodos pero se ha demostrado que el HBCD se degrada tanto mediante procesos abióticos como bióticos en estos medios.<sup>11</sup> Estudios recientes<sup>29,38-40</sup> han demostrado que el HBCD, como los demás contaminantes quirales halogenados, sigue diferentes rutas de degradación dependiendo de las condiciones en las que ésta se produce y de las enzimas que intervienen en el proceso. En condiciones aerobias y en presencia de deshalogenasas de *Sphingobium indicum* B90A LinA2,<sup>40</sup> se produce la degradación preferencial del (-)  $\beta$ -HBCD, mientras que

el resto de los estereoisómeros del HBCD apenas sufren biodegradación. Esto da lugar a un exceso enantiomérico de (+)  $\beta$ -HBCD de hasta el 90%, manteniéndose inalterada la relación enantiomérica para el  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HBCD. En condiciones anaerobias, los isómeros  $\beta$  y  $\gamma$  se degradan en lodos más rápidamente que el isómero  $\alpha$ ,<sup>41</sup> pero no se produce degradación enantioselectiva.<sup>42</sup> Tampoco se ha observado degradación enantioselectiva en la mayoría de los suelos estudiados.

## 2.4. TOXICIDAD ESTEREOSELECTIVA

Se han realizado numerosos estudios sobre la toxicidad del HBCD,<sup>43,44</sup> pero muy pocos de ellos distinguen entre los efectos producidos por sus diferentes estereoisómeros.<sup>45</sup> Todos estos estudios han demostrado que el HBCD es tóxico tanto para organismos terrestres como acuáticos, con importantes efectos sobre su supervivencia, reproducción y desarrollo. La baja solubilidad del HBCD en agua dificulta el estudio de la ecotoxicidad de este contaminante en medios acuáticos. No obstante, se ha podido constatar que debido a las bajas concentraciones presentes en agua, el HBCD tiene una baja toxicidad para organismos acuáticos a corto plazo, pero a largo plazo su toxicidad aumenta.<sup>11</sup> Se ha demostrado que el HBCD influye en la acción que ejercen las hormonas tiroideas y las enzimas hepáticas en la trucha arcoíris,<sup>43</sup> siendo los isómeros  $\alpha$  y  $\beta$ -HBCD los que más afectan a los procesos de detoxificación hepática, mientras que los isómeros  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HBCD son los que ejercen mayor influencia en la función de la hormona tiroidea. El HBCD también origina cambios importantes en los niveles de las hormonas tiroideas en el salmón después de 30 días de exposición al contaminante.<sup>46</sup> En estudios realizados con un crustáceo planctónico, la *daphnia magna*, se ha observado una reducción del crecimiento del organismo después de 21 días de exposición a concentraciones de HBCD superiores a  $5,6 \mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>47</sup>

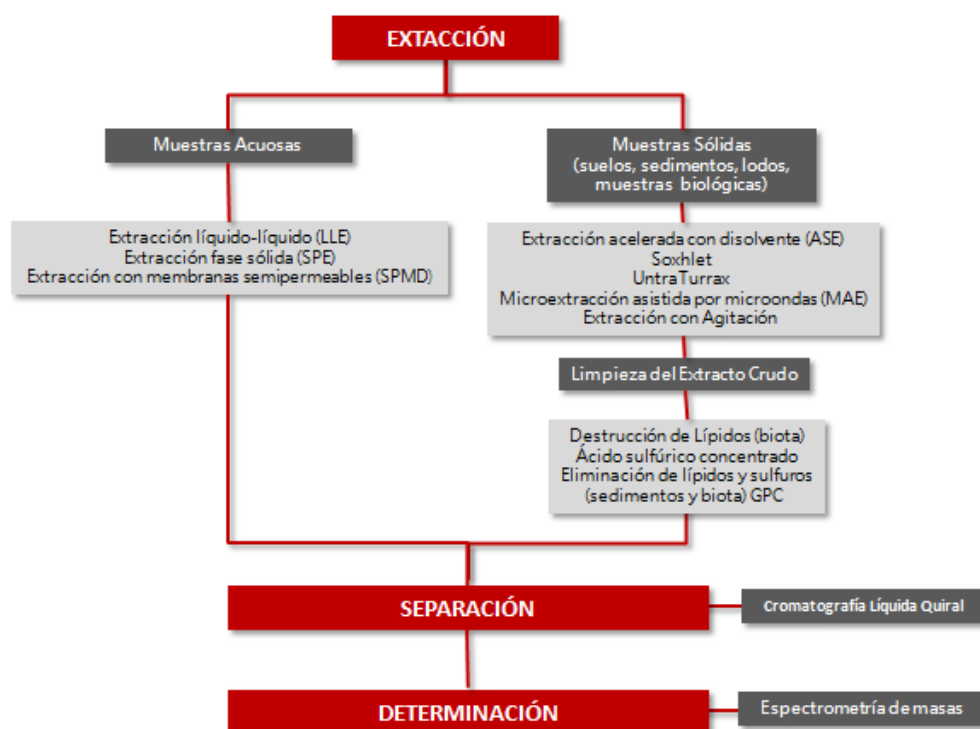
En cuanto a los organismos terrestres, se ha observado una reducción en la reproducción de los gusanos de tierra cuando se exponen a HBCD durante 56 días a concentraciones del orden de los  $\mu\text{g g}^{-1}$ .<sup>48</sup> y estudios realizados con ratones mostraron que el HBCD produce efectos adversos en el hígado y el tiroides de estos animales.<sup>49</sup>

Los estudios sobre toxicidad enantioselectiva del HBCD se limitan a los realizados por Zhang y col.<sup>45</sup> con células hepáticas Hep 62. Los resultados obtenidos muestran que la citotoxicidad de los isómeros disminuye en el orden  $\alpha$ -HBCD  $\geq$   $\beta$ -HBCD  $>$   $\gamma$ -HBCD y que todos los enantiómeros (+) son más citotóxicos que los enantiómeros (-).

## 2.5. ANÁLISIS ESTEREOSELECTIVO

### 2.5.1. Tratamiento de muestras medioambientales

La determinación de los estereoisómeros del HBCD se realiza usando cromatografía de líquidos quirales acoplada a espectrometría de masas tras someter a la muestra a diferentes procesos de extracción y limpieza que varían en función de la matriz de la muestra analizada (Figura 2.2). Estos tratamientos son prácticamente los mismos que los utilizados para la determinación del HBCD total.



**Figura 2.2.** Procedimientos para la determinación estereoselectiva de HBCD en muestras medio ambientales.

La extracción de muestras acuosas se realiza usando extracción líquido-líquido<sup>50</sup> (liquid-liquid extraction, LLE), extracción en fase sólida (solid phase extraction, SPE) o extracción con membranas semipermeables (semipermeable membrane divices, SPMDs)<sup>51</sup> y la extracción de muestras sólidas (suelo, sedimentos, lodos y matrices biológicas) se lleva a cabo utilizando

extracción Soxhlet,<sup>20,50,52,53</sup> asistida por microondas (Microwave-assisted Extraction, MAE)<sup>54</sup> o acelerada con disolventes (Accelerated Solvent Extraction, ASE).<sup>55,56,53</sup> La limpieza de las muestras de sedimentos, suelo y lodos generalmente incluye la eliminación de azufre usando cobre activado o sulfato de tetrabutilamonio, propanol y agua<sup>54</sup> y extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction, SPE) usando columnas de sílice y alumina,<sup>57</sup> sílice ácida y neutra<sup>58</sup> o gel de sílice<sup>59</sup> y elución con disolventes apolares. Los extractos de muestras biológicas se someten a procesos de limpieza multietapa que con frecuencia incluyen cromatografía de exclusión por tamaños, seguida de SPE y/o tratamiento con ácido sulfúrico.<sup>20,50-53,55,56,60</sup>

### 2.5.2. Separación y detección

Como se ha comentado anteriormente, la separación de los estereoisómeros se lleva a cabo usando cromatografía de líquidos quiral. No es posible usar cromatografía de gases porque a temperaturas superiores a 160 °C se produce interconversión de los isómeros y a temperaturas inferiores a 160 °C los analitos no se eluyen de la columna cromatográfica.<sup>61</sup>

La separación de los diastereoisómeros del HBCD se realiza usando fases estacionarias de sílice-C<sub>18</sub> y la de los enantiómeros utilizando fases estacionarias de ciclodextrinas. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos constituidos por unidades de D-glucosa unidas entre sí mediante enlaces 1,4-glicosídicos que se orientan en el espacio formando un toroide truncado. El número de unidades glucosa 6, 7 y 8 para la  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina, respectivamente, determina el tamaño de su cavidad interior (5,7 Å, 7,8 Å y 9,5 Å)<sup>62</sup> y el tamaño de los analitos que permiten separar. La separación de (+) $\alpha$ -, (-) $\alpha$ -, (+) $\beta$ -, (-) $\beta$ -, (+) $\gamma$ - y (-) $\gamma$ -HBCD se lleva a cabo usando fases estacionarias de beta ciclodextrina permetilada enlazada a polisiloxano a través de una cadena hidrocarbonada de 8 átomos de carbono.<sup>52</sup> Las fases móviles son mezclas de agua y disolventes orgánicos con gradiente de elución. En estas condiciones, la retención de los analitos se produce mediante su incorporación en el interior de la cavidad apolar de la ciclodextrina formando complejos de inclusión con diferente constante de formación para cada uno de los estereoisómeros.

En cuanto al sistema de detección, la espectrometría de masas proporciona la sensibilidad y selectividad necesarias para la determinación estereoselectiva del HBCD en muestras medioambientales. Generalmente se utilizan fuentes de ionización de electrospray (Electrospray ionization, ESI) en modo negativo, aunque también se ha propuesto el uso de fuentes de ionización química a presión atmosférica (atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI).<sup>60</sup> Los analizadores usados han sido trampa de iones,<sup>54,63</sup> triple

cuadrupolo<sup>52,53,55,56,60,63</sup> y un analizador híbrido de triple cuadrupolo con trampa iónica lineal.<sup>20,61,64</sup>

A pesar de utilizar complejos procesos de extracción y tratamiento de muestra, los métodos descritos para la determinación estereoselectiva de HBCD presentan problemas de efecto matriz, por lo que generalmente utilizan el método de calibración de patrón interno con estándares marcados isotópicamente para corregir estos efectos. Los efectos matriz son debidos a sustancias interferentes que coeluyen con los analitos inhibiendo su ionización y causando una disminución de la señal obtenida en espectrometría de masas.

## 3. PIRETROIDES

Los piretroides sintéticos son plaguicidas usados como insecticidas. Se desarrollaron con el objeto de mejorar la actividad biológica y estabilidad frente a la luz y el calor de las piretrinas naturales obtenidas a partir de la flor del crisantemo que se venían usando como insecticida desde 1850. Pueden obtenerse a partir del ácido crisantémico variando los sustituyentes del anillo ciclopropano y el alcohol esterificado.<sup>65</sup> Y se clasifican atendiendo a dos criterios: (I) la época en la que fueron sintetizados<sup>66</sup> y (II) su naturaleza química.<sup>67</sup> En el primer caso se distingue entre piretroides de 1ª generación sintetizados a partir de 1949 (alletrina, bioaletrina, bioresmetrina, fenvalerato, permetrina, cipermetrina y deltamtrina) y piretroides de 2ª generación sintetizados a partir de 1980 (ciflutrina, flumetrina, fenpropano, fluvalinato, cihalotrina, bifentrina y teflutrina entre otros). De acuerdo con su naturaleza química se dividen en ésteres (acrinatrina, cipermetrina, deltametrina, permetrina, bifentrina, fenvalerato y fluvalinato entre otros) y éteres (etofenprox, flufenprox, halfenprox).<sup>68</sup>

Los piretroides constituyen el 25 % de los plaguicidas comercializados, siendo la mayoría de ellos compuestos quirales.<sup>69</sup> Estos insecticidas se utilizan en todo el mundo para controlar plagas en agricultura, ganadería, silvicultura, hogares, mascotas y productos almacenados.<sup>70,71</sup> Su uso en agricultura está aumentando rápidamente debido a las restricciones de otros insecticidas como los plaguicidas organoclorados que son persistentes, bioacumulables y carcinógenos, y los plaguicidas organofosforados y carbamatos, muy tóxicos para mamíferos.<sup>72</sup> La actividad insecticida de los piretroides se basa en su efecto sobre los canales de sodio implicados en la transmisión del impulso eléctrico entre los axones del sistema nervioso del insecto. El insecticida estimula las células nerviosas produciendo shocks eléctricos y paralizando totalmente al insecto.<sup>73</sup> Los piretroides son menos tóxicos para los mamíferos que los plaguicidas organofosforados y carbamatos pero presentan una alta toxicidad en exposiciones prolongadas, produciendo diferentes efectos adversos, siendo los que afectan al sistema nervioso los más severos.<sup>74</sup>

Aunque la estereoquímica de los piretroides afecta a su actividad insecticida,<sup>71,75-78</sup> (generalmente sólo uno de los enantiómeros presentan actividad biológica) sólo el 6% de los piretroides comercializados están disponibles como isómeros individuales<sup>79</sup> o como enantiómeros puros.<sup>68</sup>



### 3.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

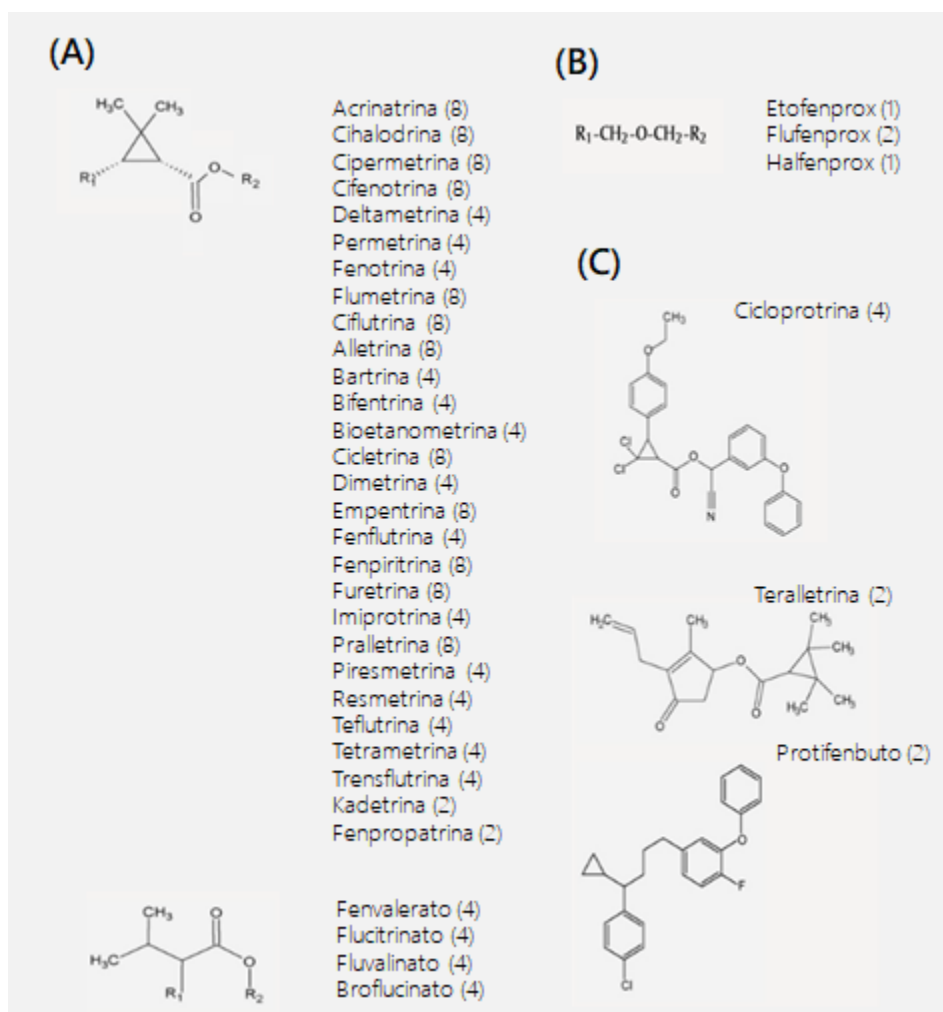
En general, los piretroides son más estables frente a la luz solar que las piretrinas naturales, aunque algunos son fotolábiles como la bioaletrina<sup>80</sup> o bioresmetrina.<sup>80,81</sup> Por otra parte, los piretroides con sustituyentes ciano en un carbono asimétrico como la cipermetrina y ciflutrina<sup>82</sup> presentan isomerización al aumentar la temperatura en presencia de disolventes orgánicos y otros como la deltametrina presentan epimerización en presencia de luz o disolventes polares.<sup>83-85</sup> La mayoría son apolares con baja solubilidad en agua, alta constante octanol/agua y baja presión de vapor, tal como se muestra en la Tabla 3.1.<sup>86,87</sup>

**Tabla 3.1.** Propiedades fisicoquímicas de algunos piretroides.

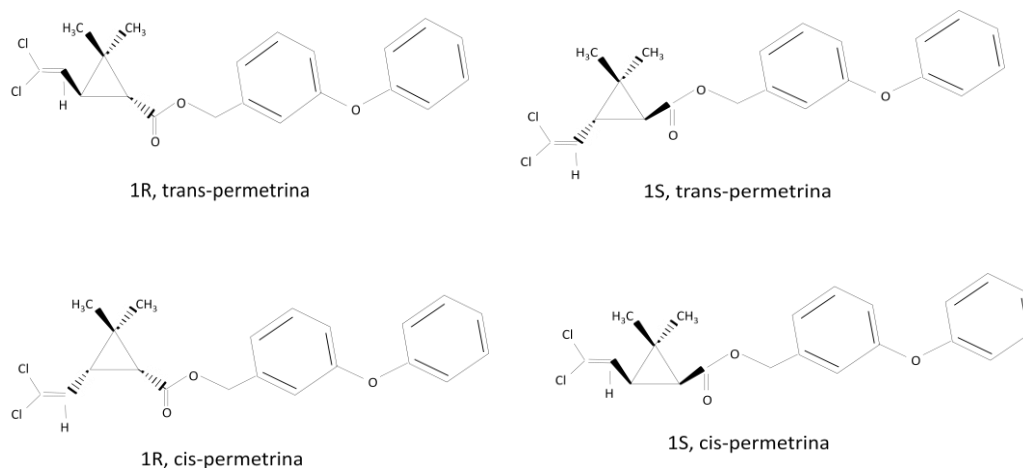
Pesticida	Formula molecular	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Presión de vapor (Pa)	K <sub>OW</sub> <sup>87</sup>	Solubilidad en agua (µg L <sup>-1</sup> )
Cihalotrina	C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>	449,9	2-3,45x10 <sup>-7</sup>	6,8	5
Cipermetrina	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	416,3	2,3 x10 <sup>-7</sup>	6,6	9
Cifenotrina	C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	375,5	1,2 x10 <sup>-4</sup>	6,6	9
Deltametrina	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Br <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	505,2	1,24 x10 <sup>-8</sup>	6,2	0,2
Permetrina	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	391,3	2,9 x10 <sup>-6</sup>	6,5	6
Ciflutrina	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> FNO <sub>3</sub>	434,3	9,6 x10 <sup>-7</sup>	6,0	2
Alletrina	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	302,4	1,6x10 <sup>-4</sup>	4,8	
Empentrina	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	274,4	1,4 x10 <sup>-2</sup>	6,2	111
Pralletrina	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	300,4	1,3 x10 <sup>-5</sup>	>4,5	8
Teflutrina	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> ClF <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	418,7	8,4 x10 <sup>-3</sup>	6,5	15
Tetrametrina	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	331,4	2,1 x10 <sup>-3</sup>	4,7	1.830
Tralometrina	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Br <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	665,0	4,8 x10 <sup>-9</sup>	7,6	80
Fenpropatrina	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	349,4	7,3 x10 <sup>-4</sup>	5,7	14
Fenvalerato	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>3</sub>	419,9	1,9 x10 <sup>-5</sup>	6,2	10
Etofenprox	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	376,5	8,13 x10 <sup>-7</sup>	7,1	22,5
Flufenprox	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> ClF <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	450,9	1,3 x10 <sup>-7</sup>	8,1	2,5

Los piretroides pueden tener entre 1 y 3 centros quirales, y por lo tanto, pueden presentar entre 2 y 8 estereoisómeros. En la Figura 3.1 se muestran las estructuras químicas generales de los piretroides pertenecientes al grupo de los ésteres (A), éteres (B) y a otros grupos estructurales (C).<sup>68</sup> También se incluye el número de estereoisómeros en piretroides

pertenecientes a cada uno de estos grupos. En la Figura 3.2 se muestran los cuatro estereoisómeros de la permetrina, el piretroide investigado en esta Tesis Doctoral.



**Figura 3.1.** Estructuras químicas generales de los piretroides: (A) ésteres (B) éteres (C) otros grupos estructurales. Entre paréntesis se muestra el número de estereoisómeros para piretroides pertenecientes a cada uno de los tres grupos estructurales.



**Figura 3.2.** Estereoisómeros de la permetrina.

### 3.2. RESIDUOS DE PIRETROIDES EN ALIMENTOS. LEGISLACIÓN EUROPEA

La política europea en materia de seguridad de los alimentos tiene como principales objetivos proteger la salud humana y asegurar el buen funcionamiento del mercado único europeo. En este sentido, la Unión Europea vela por el establecimiento y aplicación de normas para el control de la calidad de alimentos y piensos, la sanidad animal y vegetal y la prevención de la contaminación de los alimentos con sustancias nocivas.<sup>88</sup> Los principios generales de la legislación actual en materia de alimentación entraron en vigor en 2002, con el Reglamento (CE) nº 178/2002,<sup>89</sup> reglamento por el que también se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), organismo encargado de ofrecer asesoramiento científico independiente sobre los riesgos relacionados con los alimentos.

Los plaguicidas son uno de los grupos de contaminantes más importantes que se pueden encontrar en los alimentos. En la Unión Europea (UE), todos los alimentos destinados al consumo humano y los piensos animales están sujetos a un límite máximo de residuos (LMR) de plaguicidas,<sup>90</sup> con el fin de proteger la salud humana y animal. Los LMR de plaguicidas en alimentos se encuentran regulados en el Reglamento (CE) nº 396/2005 del 23 de Febrero de 2005.<sup>91</sup> Estos límites se establecen siguiendo criterios de toxicidad y hábitos de consumo, además de tener en cuenta la cantidad mínima de plaguicida que permite proteger a los cultivos de forma efectiva. Los LMR son revisados continuamente por la EFSA y modificados a

tenor de los nuevos datos disponibles. Estas modificaciones se recogen en una base de datos disponible en Internet.<sup>92</sup>

El Reglamento CE nº 178/2002 también establece un sistema de alerta rápida para alimentos y piensos (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF),<sup>93</sup> que permite a los Estados miembros y a la Comisión intercambiar información con rapidez y coordinar sus respuestas a las amenazas sanitarias debidas a alimentos o piensos contaminados. Dependiendo de la gravedad del riesgo, las notificaciones del RASFF pueden ser: 1) Notificaciones de alerta que se producen cuando están a la venta alimentos o piensos que presentan un grave riesgo y deben emprenderse acciones de forma rápida, 2) notificaciones de información, que se usan en la misma situación pero el producto no se encuentra en el mercado o el riesgo no se considera grave, 3) notificaciones de rechazo en frontera que afecta a las remesas de alimentos y piensos que se han examinado y rechazado en las fronteras exteriores de la UE al detectarse un riesgo sanitario, y 4) notificaciones transmitida a los miembros bajo el epígrafe de noticias sobre cualquier información relacionada con la seguridad de los alimentos y los piensos que no se haya comunicado como una notificación de alerta o de información, pero que las autoridades de control hayan considerado interesante. La presencia de plaguicidas en alimentos, fundamentalmente frutas y verduras, a concentraciones superiores a sus LMR da lugar a notificaciones del RASFF con relativa frecuencia en Europa. Uno de los casos más conocidos se produjo en 2003 cuando se destruyó una partida de pimientos colombianos por triplicar el límite máximo permitido de permetrina.

### 3.3. TOXICIDAD ESTEREOSELECTIVA

Los piretroides presentan elevada toxicidad aguda para insectos y para la mayoría de los organismos acuáticos, incluidos peces, y toxicidad aguda moderada o baja para humanos y mamíferos. En este último caso, la toxicidad aumenta considerablemente al aumentar el tiempo de exposición. En todos los casos actúan como neurotóxicos. Estudios realizados en mamíferos han mostrado que pueden causar convulsiones, temblores, descoordinación, parálisis, etc.<sup>94</sup> Determinados piretroides como la permetrina también puede producir supresión del sistema inmunológico, daños en el bazo y en los nodos linfáticos y carcinogénesis.<sup>95</sup> Además, los efectos nocivos que ejercen los piretroides en los niños son mayores que en adultos. Así, por ejemplo, la permetrina es cinco veces más tóxica para niños que para adultos.<sup>96</sup>

Por otra parte, la toxicidad de los piretroides es altamente dependiente de la estereoquímica de los compuestos.<sup>71</sup> Así, los isómeros -cis y -trans presentan diferente toxicidad y esta

también varía con la configuración del carbono quiral adyacente al grupo carboxílico<sup>97</sup> y, en los piretroides con un grupo ciano, con la configuración del carbono quiral unido a este grupo.<sup>97</sup> En general los isómeros *cis* son más tóxicos que los *trans* y, por lo tanto, la toxicidad de la mezcla de dos isómeros depende del porcentaje de cada isómero presente en la mezcla. Por ejemplo, la *cis*-permetrina es 10 veces más tóxica que la *trans*-permetrina<sup>95</sup> y, en ratas, la dosis letal 50 (LC<sub>50</sub>) de la permetrina aumenta de 224 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal a 6.000 mg kg<sup>-1</sup> cuando aumenta la proporción del isómero *trans* del 20 al 80%.<sup>71</sup> En lo que se refiere a diferencias de toxicidad entre enantiómeros, podemos citar varios ejemplos. El enantiómero *R* de la permetrina es 25 veces más tóxico para moscas que el *S*.<sup>98</sup> Sin embargo, la configuración *S* del Fenvalerato<sup>97</sup> y fluvalinato<sup>99</sup> es de 10 a 100 veces más tóxica para moscas que la configuración *R*. Otro ejemplo lo encontramos en los piretroides con un grupo ciano en el carbono quiral bencílico como el fenvalerato en los que la configuración *S* de este carbono es entre 20 y 100 veces más tóxica que la configuración *R*.<sup>100</sup> En otros casos solo determinados enantiómeros son activos como, por ejemplo, en la cipermetrina, en la que la actividad insecticida solo está asociada a dos de los 8 enantiómeros, el 1*R*, *cis*, α*S* y el 1*R*, *trans*, α*S*.<sup>82</sup>

La estéreotoxicidad de los piretroides puede deberse a las diferencias estructurales que afectan a las interacciones con los receptores biológicos, pero también a diferencias en la velocidad de metabolización de los diferentes estereoisómeros en los organismos vivos. Así, por ejemplo, la carboxilesterasa hCE-1 y hCE-2 presentes en el hígado humano, hidrolizan más rápidamente a los isómeros *trans* de la permetrina y de la cipermetrina que a los isómeros *cis* de estos piretroides<sup>101</sup> y experimentos realizados con ratas de laboratorio demuestran que la cantidad de enantiómero dextrógiro de la zeta-*trans*-cipermetrina presente disminuyen más rápidamente en el plasma, corazón, hígado y riñón del animal que el enantiómero levógiro.<sup>102</sup>

### 3.4. ANÁLISIS ESTEREOSELECTIVO

A pesar de la diferente toxicidad que presentan los estereoisómeros de los plaguicidas quirales, no se han establecido diferencias en los límites máximos permitidos en alimentos para estos estereoisómeros, en gran parte debido a que prácticamente no existen métodos que permitan la determinación estereoselectiva de estos compuestos. En el caso concreto de los piretroides, en la bibliografía podemos encontrar algunos métodos para la determinación de isómeros en alimentos<sup>103-105</sup> pero no de enantiómeros. La determinación de enantiómeros de piretroides sólo se ha descrito para muestras medioambientales.<sup>68</sup> A continuación,

comentaremos los tratamientos propuestos para la determinación de piretroides en alimentos y los métodos cromatográficos descritos para la separación de estereoisómeros.

### 3.4.1. Tratamiento de muestras de alimentos

La mayoría de los métodos propuestos para la determinación de piretroides en alimentos se centran en el análisis de frutas y verduras,<sup>103,104,106-109</sup> aunque también se han descrito métodos para el análisis de otros tipos de muestras como papillas para bebés<sup>110</sup> o mezclas de alimentos usados como modelo de ingesta.<sup>105</sup> El método más usado para el tratamiento de estas muestras es el método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)<sup>103,104,106</sup> que implica la extracción de los piretroides en acetonitrilo (15-40 mL) en presencia de sales, generalmente NaCl y MgSO<sub>4</sub>, centrifugación, separación del sobrenadante y limpieza mediante extracción en fase sólida dispersiva usando mezcla de adsorbentes (ej. adsorbentes de carbón en combinación con cambiadores iónicos con grupos amina<sup>103,106</sup> o sílice-C<sub>18</sub><sup>104</sup>). También se han propuesto métodos basados en el uso de otros disolventes orgánicos como acetona, metanol, etanol o diclorometano (5-150 mL), con frecuencia usando extracción asistida por ultrasonidos<sup>108</sup> o microondas.<sup>109</sup> En estos métodos, la técnica más usada para realizar la limpieza de los extractos ha sido extracción en fase sólida,<sup>105,110</sup> aunque también se han utilizado otras técnicas como microextracción en fase sólida<sup>108</sup> o combinación de varias técnicas (ej. extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida<sup>107</sup>). Generalmente, los métodos también incluyen etapas de evaporación para realizar cambios de disolvente previos a los procesos de limpieza o para concentrar los extractos.

### 3.4.2. Separación y detección

La mayoría de los métodos propuestos para la separación de estereoisómeros de los piretroides se basan en cromatografía líquida o cromatografía de gases usando diferentes fases estacionarias según la separación se limite a isómeros o se lleve también a cabo la separación de enantiómeros. La fase estacionaria más utilizada para separar isómeros mediante cromatografía de líquidos han sido de sílice-C<sub>18</sub><sup>68</sup> usando como fase móvil mezclas de agua y metanol. En cromatografía de gases se usan fases estacionarias de dimetilpolisiloxano<sup>111</sup> o de dimetilpolisiloxano con pequeños porcentajes de fenilo y polietilenglicol.<sup>112</sup>

La separación de enantiómeros implica el uso de fases estacionarias quirales. Las más usadas en cromatografía de gases han sido las de ciclodextrinas derivadas con metilos (permetiladas,

PM), 2,6-di-O-butil-3-O butiril (DBB) y 2,6- di-O-nonil-3-O-trifluoroacetil (DNT).<sup>68</sup> Los estereoisómeros de determinados compuestos como la cipermetrina y la ciflutrina no pueden separarse mediante cromatografía de gases, ya que a altas temperaturas (>160°C) sufren procesos de degradación enantioselectiva y epimerización. En cromatografía de líquidos se han usado fases estacionarias de ciclodextrinas,<sup>95</sup> proteínas, éteres corona, polisacáridos,<sup>113</sup> poliacrilamidas, tensioactivos quirales poliméricos, antibióticos macrocíclicos y tipo Pirkle.<sup>114</sup> Así, por ejemplo, los estereoisómeros del fenproanato, fenvalerato, cipermetrina y ciflutrina<sup>97,115,116</sup> se han separado en columnas tipo Pirkle usando una fase móvil compuesta por hexano con un 0,1% de 2-propanol, aunque no se ha conseguido separar completamente los 8 estereoisómeros de la cipermetrina. La separación de los enantiómeros de la cis-bifentrina se ha realizado en columnas con fases estacionarias de éteres corona y con fases móviles de hexano/diclorometano o hexano/isopropanol/etanol. Finalmente, se han usado diferentes tipos de ciclodextrinas para la separación de los estereoisómeros de la cipermetrina y permetrina y polisacáridos para separar los estereoisómeros del tau-fluvalinato, permetrina y  $\lambda$ -ciahlodrina<sup>78,117</sup> usando tanto fase normal como inversa.

Otras técnicas utilizadas para la separación de estereoisómeros de piretroides han sido la electroforesis capilar (CE)<sup>99,118</sup> y la cromatografía con fluidos supercríticos.<sup>119</sup> Los selectores quirales utilizados en CE han sido ciclodextrinas<sup>99</sup> y polisacáridos<sup>118</sup> y en cromatografía con fluidos supercríticos se han usado columnas quirales tipo Pirkle.<sup>119</sup>

Los detectores usados en combinación con cromatografía de líquidos quiral han sido fotométricos<sup>95,117</sup> y de espectrometría de masas.<sup>112,122,123</sup> Los primeros han sido ampliamente utilizados en estudios de degradación<sup>84,85,120</sup> y toxicidad enantioselectivas,<sup>76,121</sup> pero no presentan la sensibilidad y selectividad necesarias para la determinación de piretroides a baja concentración en muestras complejas, como es el caso de las muestras de alimentos. El acoplamiento de la cromatografía líquida a espectrometría de masas generalmente se realiza usando una interfase de electrospray, sólo compatible con cromatografía en fase inversa, y el analizador utilizado con más frecuencia es el triple cuadrupolo.<sup>122</sup> Los detectores usados en cromatografía de gases quiral incluyen detectores de ionización de llama,<sup>112</sup> captura electrónica<sup>111,123</sup> y espectrometría de masas.<sup>111</sup>

## 4. DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES

Los disolventes supramoleculares (supramolecular solvents, SUPRAS) son líquidos nanoestructurados constituidos por agregados de compuestos anfifílicos formados mediante un proceso de coacervación. Este proceso consiste en la separación de una disolución coloidal de agregados en dos fases líquidas inmiscibles que contienen los mismos constituyentes en proporciones diferentes; la fase más concentrada es el disolvente supramolecular y la más diluida es la disolución de equilibrio.<sup>124</sup>

Los disolventes supramoleculares poseen propiedades que los hacen especialmente adecuados para su uso en procesos de extracción para una gran variedad de analitos en muestras de diferente naturaleza. Estas propiedades se derivan del carácter anfifílico de las moléculas que forman los agregados que constituyen los SUPRAS, agregados en los que los analitos pueden solubilizarse mediante diferentes tipos de interacciones, y de la alta concentración de moléculas anfifílicas ( $0,1\text{--}1\text{ mg }\mu\text{L}^{-1}$ ) en el disolvente supramolecular.

Una de las características más interesantes de los SUPRAS es la posibilidad de obtener disolvente con diferentes propiedades en función del anfífilo/os y las condiciones experimentales seleccionadas para su formación, es decir, se puede realizar una síntesis “a la carta” del SUPRAS. Además, presentan otras ventajas entre las que cabe destacar la simplicidad de su síntesis, su bajo coste, la amplia disponibilidad comercial de diferentes anfífilos que pueden usarse para su formación y la seguridad durante su síntesis y su uso en procesos de extracción, debido a que no son volátiles ni inflamables.

A continuación, se discutirán aspectos básicos de los disolventes supramoleculares incluida su síntesis, composición y nanoestructura, y otros relacionados con su uso en procesos de extracción analítica, centrando la discusión en las propiedades que determinan su capacidad de extracción. Finalmente, se discutirán brevemente sus aplicaciones analíticas.

### 4.1. SÍNTESIS

#### 4.1.1. Proceso de autoensamblaje y coacervación

La formación del SUPRAS se produce en dos etapas (Fig. 4.1). En una primera etapa, se forman agregados [micelas acuosas (3–6 nm), inversas (4–8 nm) o vesículas (30–500 nm)] mediante el ensamblaje de moléculas de anfífilo a concentraciones superiores a su



concentración de agregación crítica (cac), dando lugar a una disolución coloidal estable. La morfología de los agregados formados varía en función de la naturaleza del disolvente y de la relación de tamaños entre el grupo cabeza y la cadena hidrocarbonada del anfifilo.<sup>125</sup> Un cambio en las condiciones del medio (pH, temperatura, concentración de sal o adición de un disolvente) causa la desestabilización de la disolución coloidal debido a la formación de agregados de mayor tamaño dando lugar a la formación de pequeñas gotas de coacervado que se agrupan y se separan como una segunda fase líquida, el SUPRAS. Esta segunda fase puede ser más o menos densa que la fase en equilibrio dependiendo de la naturaleza del anfifilo que forma el SUPRAS; por ejemplo los tensioactivos no iónicos polioxietilados generalmente forman SUPRAS más densos que la fase en equilibrio, mientras que los constituidos por anfifilos aniónicos, ácidos alquilcarboxílicos y alcoholes son menos densos que la fase de equilibrio.<sup>126</sup>



**Figura 4.1.** Esquema general de la síntesis de los disolventes supramoleculares

El autoensamblaje se produce de forma espontánea y reversible mediante la asociación de especies moleculares para formar estructuras ordenadas tridimensionales como resultado del balance de interacciones atractivas y repulsivas que se producen entre las moléculas de anfifilo y de éstas con las moléculas de disolvente. El SUPRAS se forma en condiciones en las que las interacciones atractivas entre las moléculas de anfifilo están favorecidas frente a las interacciones anfifilo-disolvente, sin que se llegue a producir la precipitación del anfifilo. El enlace entre las moléculas de anfifilo se produce mediante interacciones de dispersión entre

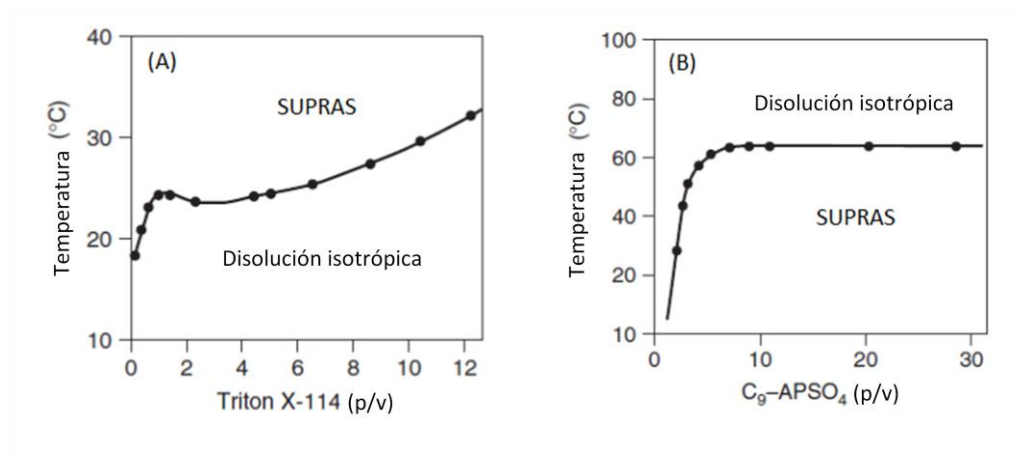
sus cadenas hidrocarbonadas y, para determinados anfifilos, interacciones entre sus grupos polares (Ej. formación de puentes de hidrógeno entre los grupos polares con grupos donadores y aceptores de hidrógeno). Estos enlaces son más débiles que los enlaces covalentes, pero actúan de forma cooperativa dando lugar a estructuras que se mantienen estables en tanto no cambien las condiciones experimentales.<sup>127</sup> Si las condiciones cambian, los agregados se reestructuran adaptándose a las nuevas condiciones.<sup>128</sup>

Es importante destacar que la coacervación solo se produce en condiciones en las que se favorece la interacción entre las moléculas de anfifilo. Así, para inducir la coacervación de tensioactivos no iónicos se debe producir la desolvatación del grupo polioxietileno para favorecer la interacción entre las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de tensioactivo y para coacervar tensioactivos iónicos, se deben evitar las interacciones repulsivas entre sus grupos polares. A continuación, se discuten las diferentes estrategias descritas para inducir la coacervación.

#### 4.1.2. Factores inductores de la coacervación

**1. Cambio de temperatura.** La temperatura ha sido el factor inductor de coacervación más común en disoluciones coloidales de tensioactivos no iónicos (ej. alquil y alquilfenol etoxilados), zwitteriónico (ej. alquil betaina) y mezclas de tensioactivos no iónicos y no iónicos/iónicos.<sup>129,130</sup> La temperatura a la que las disoluciones coloidales empiezan a enturbiarse debido a la formación del SUPRAS se denomina temperatura de punto de nube "*cloud point temperature* (CPT)". El CPT depende de la estructura y concentración del tensioactivo y de la naturaleza y la concentración de electrolitos y compuestos orgánicos presentes en la disolución coloidal. La Figura 4.2 muestra a modo de ejemplo el diagrama de fases para el tensioactivo no iónico Triton X-114 (Fig. 4.2 A) y el tensioactivo anfótero C<sub>9</sub>-APSO<sub>4</sub> (Fig. 4.2 B) en medio acuoso.

Cuando la temperatura de una disolución de tensioactivo no iónico aumenta por encima de la CPT se produce la desolvatación del grupo polar del tensioactivo, la reducción del área ocupada por el grupo cabeza y el acercamiento de las micelas presentes en la disolución coloidal, lo que favorece la formación de agregados de mayor tamaño y la generación del SUPRAS. El valor de CPT es inversamente proporcional a la longitud de la cadena hidrocarbonada del tensioactivo y directamente proporcional al número de grupos etoxilados que contiene.<sup>131,132</sup>



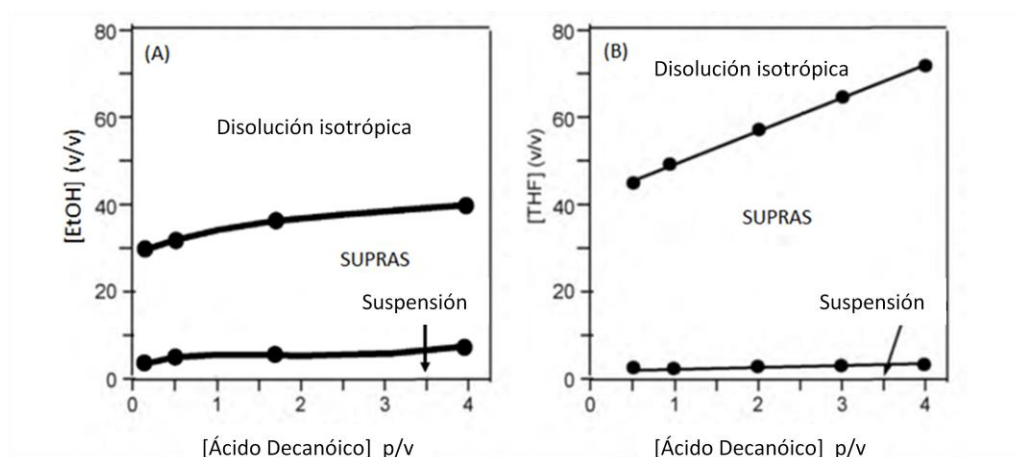
**Figura 4.2.** Diagrama de fases Temperatura- concentración de tensioactivo para (A) Tritón X-114 y (B) 3-(nonildimetilamonio)propil sulfato (C<sub>9</sub>-APSO<sub>4</sub>).

El valor de CPT de mezclas de tensioactivos no iónicos es un valor intermedio entre los valores de CPT de tensioactivos puros<sup>133</sup> y la CPT de mezclas de tensioactivos no iónicos e iónicos es superior al del correspondiente tensioactivo no iónico, debido a que la repulsión electrostática entre los grupos cargados de las moléculas de tensioactivo iónico desfavorece la coacervación.<sup>134</sup> El CPT para estos SUPRAS está muy influenciado por la presencia de electrolitos, llegando en algunos casos a disminuir por debajo de la CPT del tensioactivo no iónico.<sup>134</sup>

Los tensioactivos anfóteros coacervan cuando la temperatura disminuye por debajo de un valor crítico (Fig. 4.2 B). El valor de CPT disminuye a valores de pH inferiores al pK<sub>a</sub> de los tensioactivos y aumenta en presencia de electrolitos.<sup>130</sup>

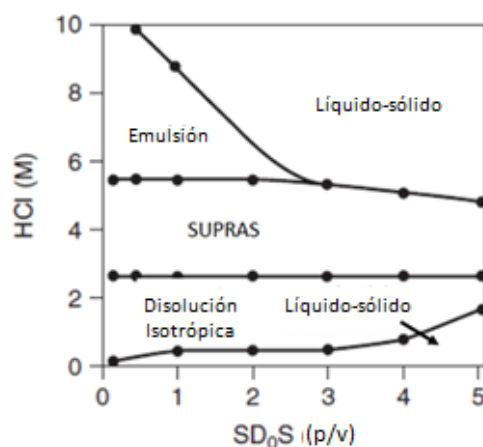
**2. Adición de agua.** En el caso de compuestos anfífilos no iónicos insolubles en agua se pueden sintetizar SUPRAS disolviendo el anfífilo en un disolvente orgánico miscible con agua y añadiendo posteriormente agua como inductor de la coacervación. Esta estrategia se ha usado para formar SUPRAS de ácidos alquilcarboxílicos<sup>135</sup> y alcoholes<sup>136</sup> con longitudes de cadena comprendidas entre 6 y 18 átomos de carbono. Para que se produzca la coacervación de los ácidos alquilcarboxílicos (pK<sub>a</sub> = 4,8 ± 0,2), el pH del agua debe ser igual o inferior a 4, con el fin de que el tensioactivo se encuentre en su forma neutra, mientras que en la caso de los alcoholes (pK<sub>a</sub> ~15) la coacervación se produce con independencia del pH del agua.

Se pueden utilizar una gran variedad de disolventes próticos y apróticos para disolver compuestos anfífilos no iónicos (ej. dioxano, tetrahidrofurano, acetona, acetonitrilo, metanol, propanol, etilenglicol, dimetilformamida, etc.).<sup>135</sup> En la Figura 4.3 se muestra a modo de ejemplo el diagrama de fases obtenido para el ácido decanoico en mezclas hidroorgánicas (A) etanol-agua y (B) tetrahidrofurano-agua. La proporción relativa de disolvente orgánico/agua a la que se forma el SUPRAS varía en función del disolvente orgánico usado y de la longitud de la cadena hidrocarbonada del tensioactivo. Los disolventes con baja constante dieléctrica como el THF presentan una región para la formación de SUPRAS muy amplia. La temperatura y la concentración de electrolitos no afectan a la formación del disolvente. La nanoestructura y propiedades del SUPRAS varían en función de la proporción relativa de disolvente orgánico a agua usada para la coacervación.



**Figura 4.3.** Diagrama de fases del ácido decanoico en mezclas de (A) etanol-agua y (B) tetrahidrofurano-agua.

**3. Adición de ácido.** La neutralización del grupo cabeza mediante la adición de ácidos a elevada concentración (3-4 M) da lugar a la formación de disolventes supramoleculares en disoluciones micelares acuosas de tensioactivos aniónicos del grupo de los alquilsulfonatos, alquilbencenosulfonatos, alquilsulfatos y alquilsuccinatos.<sup>137</sup> La concentración de ácido requerida para la coacervación varía con la estructura molecular y concentración del tensioactivos pero es independiente de la temperatura y de la concentración de sales inorgánicas.<sup>137-141</sup> A modo de ejemplo, en la Figura 4.4 se muestra el diagrama de fases obtenido para el dodecilsulfonato sodico (SDoS). La temperatura de la disolución coloidal no influye en los límites de la región de formación del SUPRAS.<sup>137,138</sup>



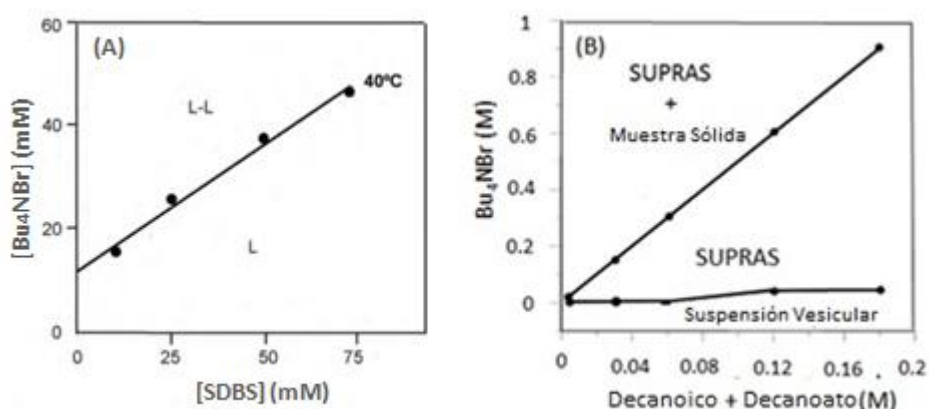
**Figura 4.4.** Diagrama de fases para el dodecilsulfonato sódico (SDoS) en función de la concentración de HCl.

**4. Adición de contraiones orgánicos.** Estos agentes coacervantes inducen la formación de SUPRAS tensioactivos iónicos en disolución acuosa neutralizando su grupo cabeza y evitando de esta forma las interacciones repulsivas entre estos grupos. Los contraiones orgánicos usados para inducir la formación de disolventes de tensioactivos iónicos varían en función de la naturaleza del anfífilo. Entre los usados para la coacervación de disolventes de tensioactivos aniónicos se incluyen las sales de tetraalquilamonio,<sup>142-145</sup> benciltrialquilamonio,<sup>142</sup> trialquilamonio<sup>146</sup> y guanidinio<sup>147</sup> que inducen la coacervación en disoluciones micelares acuosas de alquilbencenosulfonatos,<sup>142,143</sup> alquilsulfatos,<sup>144</sup> perfluoroalquilcarboxilatos<sup>145</sup> y alquilcarboxilatos.<sup>146,147</sup> Para la formación de disolventes supramoleculares de tensioactivos catiónicos se ha propuesto la adición de salicilato y toxilato.<sup>148</sup> Además de neutralizar la carga del tensioactivo, los contraiones anfífilos de alquilamonio actúan como puente de unión entre agregados micelares de tensioactivos aniónicos, ya que poseen anillos aromáticos y/o varias cadenas hidrocarbonadas que les permiten enlazarse a dos micelas simultáneamente mediante interacciones de dispersión con las cadenas hidrocarbonadas del tensioactivo.<sup>142</sup> El catión guanidinio también tiene la capacidad de formar enlaces múltiples, en este caso con micelas de alquilcarboxilatos, estableciendo interacciones electroestáticas entre su grupo amino cargado positivamente y el grupo  $-C-O^-$  del tensioactivo y formando puentes de hidrógeno entre sus grupos amino neutros y el grupo  $-C=O$  del tensioactivo.<sup>147</sup>

La temperatura es una variable clave en la formación de este tipo de disolventes, además de la naturaleza y concentración del contraión y la estructura química del tensioactivo.<sup>149</sup> Así, la formación de disolventes de alquilbencenosulfonatos inducida por sales de tetraalquilamonio se produce a temperatura ambiente a elevadas concentraciones de tensioactivo [ $>40\%$  (p/v)], pero requiere el calentamiento de la disolución para formar disolventes supramoleculares a bajas concentraciones de éste. Un aumento de la longitud de la cadena hidrocarbonada del tensioactivo o de la concentración del contraión reduce la temperatura mínima para la formación del disolvente. La coacervación de alquilcarboxilatos inducida por guanidinio se produce cuando la temperatura disminuye por debajo de un valor crítico que varía en función de la longitud de la cadena hidrocarbonada del tensioactivo y su concentración.<sup>147</sup>

Las sales de tetraalquilamonio también inducen la formación de disolventes supramoleculares en mezclas equimolares de ácidos alquilcarboxílicos (HAC) y alquilcarboxilatos ( $\text{AC}^-$ ).<sup>150</sup> El contraión neutraliza las cargas negativas de las moléculas de  $\text{AC}^-$  en la superficie de las vesículas constituidas por HAC y  $\text{AC}^-$ , favoreciendo la formación de agregados vesiculares de gran tamaño. Al contrario que para los disolventes obtenidos a partir de disoluciones micelares, la formación de disolventes obtenidos a partir de disoluciones vesiculares se produce en un amplio intervalos de temperaturas (0-90 °C) sin ningún tipo de restricción.

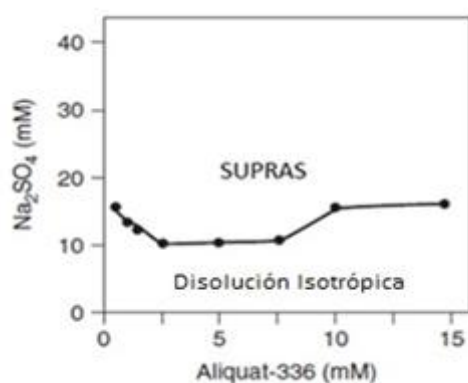
En la Figura 4.5 se muestran ejemplos de los diagramas de fases para la formación de SUPRAS inducidos por un contraión orgánico.



**Figura 4.5.** Diagrama de fases obtenido para (A) dodecilsulfato sódico y (B) disoluciones equimolares de ácido decanóico/ decanoato en función de la concentración de tetrabutlamonio.

**5. Adición de sales inorgánicas.** Otra estrategia que permite reducir las interacciones electrostáticas repulsivas entre grupos cabeza cargados y favorecer la coacervación es aumentar la fuerza iónica de la disolución acuosa mediante la adición de sales inorgánicas.

Así, la adición de la NaCl y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a disoluciones micelares acuosas de los tensioactivos catiónicos centrimida<sup>151</sup> y aliquat-336<sup>152</sup> respectivamente, ha permitido obtener disolventes supramoleculares de tensioactivos catiónicos a temperatura ambiente. La formación del disolvente de centrimida requiere además la presencia de 1-octanol. A modo de ejemplo en la Figura 4.6 se muestra el diagrama de fases obtenido para Aliquat-336 en función de la concentración de sulfato sódico.



**Figura 4.6.** Diagrama de fases obtenido para aliquat-336 en función de la concentración de sulfato de sodio.

Recientemente, se ha descrito la formación de un disolvente supramolecular formado mediante la adición de una disolución del tensioactivo catiónico gémini bromuro de etanedil-1,2-bis (dimetil) tetradecilamonio en propanol a disoluciones acuosas con concentraciones de NaCl en el intervalo 5-25% (p/v). La presencia de la sal inorgánica es imprescindible para reducir las interacciones electrostáticas repulsivas entre los grupos cabeza del tensioactivo y permitir la formación del disolvente supramolecular en la mezcla hidroorgánica.<sup>153</sup>

## 4.2. VOLUMEN Y COMPOSICIÓN

El volumen de SUPRAS formado y su composición varía en función de la estructura química de los compuestos anfífilos que los constituyen y el microambiente en el que estos

compuestos se agregan.<sup>154</sup> Ambos factores influyen en el grado de empaquetamiento de las moléculas de anfífilo en el SUPRAS, determinando la concentración de compuesto anfífilo en el disolvente y por lo tanto, su número de centros de solubilización. Composición y volumen están relacionados; generalmente un aumento de la concentración de anfífilo en el SUPRAS viene acompañado de una disminución del volumen de SUPRAS formado. La selección del compuesto anfífilo y las condiciones de síntesis permiten, por tanto, obtener SUPRAS con diferente número de centros de solubilización y capacidad de solubilización.

En la Tabla 4.1 se muestra la concentración de compuesto anfífilo presente en disolventes supramoleculares obtenidos a partir de disoluciones acuosas o hidroorgánicas de tensioactivos pertenecientes a diferentes grupos estructurales. Para SUPRAS de tensioactivos pertenecientes a un mismo grupo estructural en las mismas condiciones experimentales, un aumento del tamaño del anfífilo conduce a una disminución de su concentración en el SUPRAS y a un aumento del volumen de disolvente formado. Así, la concentración de tensioactivo en disolventes supramoleculares formados en disoluciones acuosas de tensioactivos no iónicos del grupo de los alcoholes etoxilados disminuye al aumentar el tamaño del grupo apolar y del grupo polar.<sup>155</sup> La formación de SUPRAS menos concentrados se ha atribuido a un aumento del volumen de exclusión micelar con el aumento del tamaño del tensioactivo. El efecto del tamaño del grupo polar en la composición del SUPRAS también se observa en disolventes formados en disoluciones acuosas de tensioactivos no iónicos alquilfenil etoxilados y ácidos grasos oxietilados de metil ésteres y en los formados en disoluciones ácidas de tensioactivos aniónicos. Finalmente, en los SUPRAS obtenidos en disoluciones hidroorgánicas de ácidos alquilcarboxílicos o alcoholes, un aumento de la longitud de la cadena hidrocarbonada del tensioactivo conduce a una disminución de la concentración de anfífilo y la sustitución del grupo carboxílico por un grupo alcohol, a un aumento de la concentración.<sup>135,136</sup>

Por otra parte, un aumento en la concentración de tensioactivo usada en la síntesis, lógicamente conduce a un aumento del volumen de disolvente formado. La relación entre volumen de SUPRAS y concentración de tensioactivo de síntesis es generalmente lineal, de lo que se deduce que en la mayoría de los casos la concentración de anfífilo en el SUPRAS no varía con la concentración inicial de anfífilo en la disolución. No obstante, existen algunas excepciones como es el caso de los SUPRAS de Tritón X-114 con concentraciones de anfífilo que aumentan al aumentar la concentración de tensioactivo usada en la síntesis.<sup>156</sup>

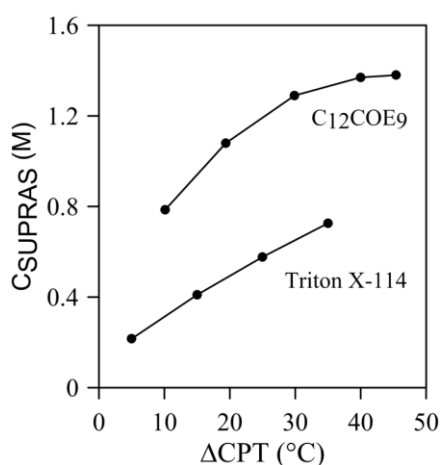


**Tabla 4.1.** Concentración de anfífilo ( $C_{\text{SUPRAS}}$ ) en SUPRAS de compuestos anfífilos pertenecientes a diferentes grupos estructurales

Anfífilos	Condiciones experimentales para la coacervación	$C_{\text{SUPRAS}}$ (M)
<i>Alcoholes etoxilados</i>		
$RO(CH_2CH_2O)_nH$		
$C_{10}E_6$	$C_0 = 0,07 \text{ M}, 0,8 \text{ M NaCl}, 80^\circ\text{C}$	1,56
$C_{12}E_6$	=	1,35
$C_{14}E_6$	=	0,45
$C_{16}E_6$	=	0,34
$C_{12}E_5$	$C_0 = 0,07 \text{ M}, 0,8 \text{ M NaCl}, 80^\circ\text{C}$	2,11
$C_{12}E_7$	=	1,06
$C_{12}E_8$	=	0,84
<i>Alquilfenil etoxilados</i>		
$R-\text{C}_6\text{H}_4(CH_2CH_2O)_nH$		
Igepal CA-620, $C_8(C_6H_4)E_7$	$C_0 = 0,05 \text{ M}, 30^\circ\text{C}$	0,24
Triton X-114, $C_8(C_6H_4)E_{7,5}$	$C_0 = 0,08 \text{ M}, 30^\circ\text{C}$	0,22
<i>Ácidos grasos oxietilados de metil ésteres,</i>		
$RCO(OCH_2CH_2)_nOCH_3$		
$C_{12}COE_9$	$C_0 = 0,041 \text{ M}, 80^\circ\text{C}$	1,29
$C_{12}COE_{11}$	$C_0 = 0,036 \text{ M}, 80^\circ\text{C}$	1,07
$C_{12}COE_{14}$	$C_0 = 0,030 \text{ M}, 80^\circ\text{C}$	0,73
<i>Alquilsulfonatos <math>RSO_3Na</math></i>		
Dodecilsulfonato sódico	$C_0 = 0,07 \text{ M}, 4 \text{ M HCl}$	1,00
<i>Alquilsulfatos <math>RSO_4Na</math></i>		
Dodecilsulfato sódico	$C_0 = 0,07 \text{ M}, 4\text{-}5 \text{ M HCl}$	0,69
<i>Dialquilsulfocinatos</i>		
$(R-COO)_2CHSO_3Na$		
Aerosol OT	$C_0 = 0,04 \text{ M}, 5 \text{ M HCl}$	2,25
<i>Ácidos carboxílicos</i>		
$RCOOH$		
Ácido octanoico	$C_0 = 0,07 \text{ M}, 90 (\%,v/v) \text{ H}_2\text{O}$	3,66
Ácido decanoico	=	3,19
Ácido dodecanoico	=	3,17
<i>Alcanoles ROH</i>		
Decanol	=	3,60

 $C_0$ : Concentración inicial de anfífilos

El microambiente en el que se forma el SUPRAS influye en su composición y volumen. Para tensioactivos no iónicos polioxetilados, la temperatura y la concentración de sales y compuestos orgánicos son los factores que más influyen en la concentración de anfífilo y el volumen de disolvente formado.<sup>149,157-159</sup> La concentración de tensioactivo en el SUPRAS aumenta y su volumen disminuye a medida que se incrementa la diferencia entre la temperatura a la que se realiza la síntesis del disolvente y la temperatura de "cloud point" ( $\Delta\text{CPT} = T - \text{CPT}$ ), debido a que aumenta la eficacia de la ruptura de los puentes de hidrógeno entre los grupos oxietileno del tensioactivo y el agua, lo que causa una disminución del contenido de agua en el SUPRAS. En la Figura 4.7 se muestra a modo de ejemplo, como varía la concentración de tensioactivo en un SUPRAS de Tritón X-114 (CPT = 25 °C) y en un SUPRAS de 9-metil dodecanoato ( $\text{C}_{12}\text{COE}_9$ , CPT = 50°C) en función de  $\Delta\text{CPT}$ .



**Figura 4.7.** Concentración de tensioactivo en un SUPRAS de Tritón X-114 y en un SUPRAS de 9-metil dodecanoato ( $\text{C}_{12}\text{COE}_9$ ) en función del  $\Delta\text{CPT}$ .

La adición de electrolitos a disoluciones acuosas de tensioactivos no iónicos polioxetilados origina cambios en la CPT del tensioactivo, la concentración de anfífilo en el SUPRAS generado y su volumen, dependiendo su efecto de la naturaleza de los iones del electrolito y su concentración.<sup>154</sup> El efecto de una determinada sal en el proceso de coacervación es el resultado del efecto combinado del catión y el anión de la sal. Para una determinada sal, el efecto aumenta a medida que lo hace su concentración.

La presencia de compuestos orgánicos también influye en la coacervación de los tensioactivos no iónicos polietoxilados, siendo su efecto muy variado.<sup>149</sup> Así, por ejemplo, los

alcoholes alifáticos de cadena corta aumentan la solubilidad del tensioactivo y por tanto, su CPT, mientras que los de cadena larga (más de 4 átomos de C) se incorporan a las micelas con la cadena hidrocarbonada en el corazón micelar y el grupo alcohol formando puentes de hidrógeno con el grupo cabeza del tensioactivo, lo que origina la deshidratación de la micela, aumenta su tamaño y reduce la CPT. Apenas existen estudios de la influencia de los aditivos orgánicos en la composición de SUPRAS de tensioactivos no iónicos polioxietilados. Se ha descrito que tensioactivos iónicos que originan aumentos de la CPT causan una disminución de la concentración de tensioactivo en el SUPRAS.<sup>160</sup> Por otra parte, compuestos orgánicos como el pirogalol y el clorofenol que causan una disminución de la CPT de determinados tensioactivos no iónicos aumentan la concentración de tensioactivo en los SUPRAS, sin embargo otros colorantes como la crisoidina y el eosin disminuyen la concentración de anfífilo en SUPRAS de tensioactivos del grupo del Tritón X, siendo su efecto más acusado cuanto mayor es la concentración de colorante.<sup>161,162</sup>

El autoensamblaje y coacervación de tensioactivos iónicos en medio acuoso también se ve afectada por las condiciones microambientales en las que éstos se producen. Así, los volúmenes de SUPRAS de tensioactivos aniónicos y catiónicos que coacervan en presencia de ácidos y sales, respectivamente, disminuyen a medida que aumenta la concentración del agente coacervante, dando lugar a SUPRAS más concentrados,<sup>137,152</sup> y para aquellos tensioactivos catiónicos que requieren un cosurfactante para que se produzca la separación de fases (Ej. formación de SUPRAS de cetrimide en presencia de octanol), el volumen de SUPRAS disminuye con la concentración de cosurfactante.<sup>151</sup>

Se han realizado estudios exhaustivos de la influencia de las condiciones microambientales en la formación de SUPRAS de ácidos alquilcarboxílicos y alcoholes en disoluciones hidroorgánicas y se han obtenido ecuaciones generales que predicen el volumen de disolvente supramolecular obtenido en función de la cantidad de tensioactivo y disolvente orgánico usado en la síntesis.<sup>154</sup> En la Tabla 4.2 se muestran las ecuaciones generales que relacionan volumen de SUPRAS con la cantidad de tensioactivo y tetrahidrofurano (THF) para alcoholes y ácidos alquilcarboxílicos con diferente longitud de cadena hidrocarbonada. El volumen de SUPRAS aumenta linealmente con la cantidad de tensioactivo y exponencialmente con el porcentaje de disolvente orgánico, aumentos que van asociados a una disminución de la concentración de tensioactivo en el disolvente supramolecular y un aumento de su contenido en agua y THF.

**Tabla 4.2.** Ecuaciones generales para la predicción del volumen obtenido para SUPRAS de alcoholes y ácidos alquilcarboxílicos en mezclas tetrahidrofurano-agua.

Anfifilos	n	Ecuación General
<i>Alcoholes</i> $CH_3(CH_2)_nOH$	6-13	$V_{SUPRAS} = X (0,17 + e^{0,0389 THF})$
<i>Ácidos Carboxílicos</i> $CH_3(CH_2)_nCOOH$		
Ácido Hexanoico	4	$V_{SUPRAS} = 0,60 X + 0,076 X THF + e^{0,104 THF}$
Ácido Octanoico	6	$V_{SUPRAS} = 1,17 X e^{0,039 THF}$
Ácido Decanoico	8	$V_{SUPRAS} = 1,05 X e^{0,047 THF}$
Ácido Dodecanoico	10	$V_{SUPRAS} = 0,92 X e^{0,056 THF}$

$V_{SUPRAS}$ : Volumen de disolvente supramolecular ( $\mu L$ ).

X: Cantidad de tensioactivo (mg).

THF: Porcentaje de tetrahidrofurano (v/v).

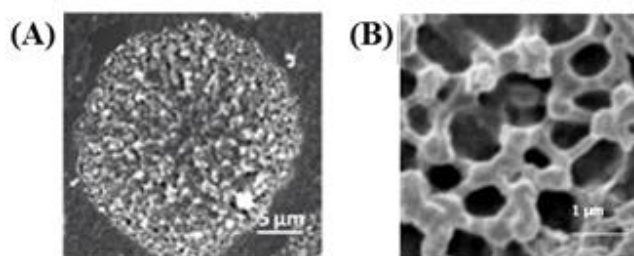
### 4.3. NANOESTRUCTURA

La morfología de los agregados que constituyen los SUPRAS varía, al igual que su volumen y composición, con el anfifilo o anfifilos que forman dichos agregados y el microambiente en el que éstos se agregan.<sup>149</sup> Así por ejemplo, las nanoestructuras observadas en disolventes supramoleculares de tensioactivos no iónicos  $C_nE_m$  varían en función del tamaño relativo de su grupo polar respecto al de su grupo apolar, de forma que los disolventes de tensioactivos con una relación n a m moderada, como el  $C_{12}E_5$ , están constituidos por micelas en forma de varilla que se unen para formar una red tridimensional,<sup>163</sup> pero cuando la relación de tamaño del grupo polar al del apolar aumenta (ej.  $C_{12}E_8$ ), la estructura esférica está energéticamente más favorecida que la cilíndrica y el disolvente está constituido por clusters de micelas esféricas.<sup>164</sup>

Las nanoestructuras de SUPRAS formados en disoluciones acuosas de tensioactivos iónicos en presencia de un contraión anfifílico varían no solo con la estructura química del tensioactivo, sino también con la del contraión, y con otros factores como la concentración de contraión y la temperatura a la que se produce la coacervación. Entre las nanoestructuras descritas para este tipo de disolventes se incluyen redes tridimensionales de micelas cilíndricas y micelas elipsoidales unidas entre sí a través de moléculas de contraión.<sup>165,166</sup>

Otro ejemplo de influencia del medio en la estructura del disolvente supramolecular lo encontramos en los SUPRAS obtenidos en mezclas hidroorgánicas THF-agua. En estos SUPRAS las moléculas de ácidos alquilcarboxílicos y alcoholes se organizan en agregados

inversos hexagonales con las cadenas hidrocarbonadas dirigidas hacia el disolvente orgánico y el grupo polar orientado hacia el interior del agregado en contacto con el agua. La proporción de cada uno de los disolventes usados en la síntesis del SUPRAS determina el tamaño de las gotas de coacervado que lo forman, y de las cavidades que contienen agua en los agregados hexagonales. Los tamaños de las gotas de coacervado y de las cavidades acuosas aumentan al aumentar el porcentaje de THF usado en la síntesis. En la Figura 4.8 se muestra la microestructura de una gota de coacervado de decanol obtenida mediante crio-SEM.



**Figura 4.8.** Nanoestructura de un SUPRAS de decanol. Imágenes obtenidas mediante crio-SEM de (A) la microestructura porosa de una gota de coacervado y (B) microestructura hexagonal de los poros de una gota de coacervado.

#### 4.4. CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN

Los disolventes supramoleculares tienen la capacidad de solubilizar sustancias químicas mediante su incorporación en los agregados de anfífilo que los constituyen. La capacidad de solubilización de un SUPRAS viene dada por la fuerza de las interacciones analito-anfífilo y el número de centros de solubilización del disolvente. Cuanto mayor es la fuerza de las interacciones y el número de los centros de solubilización mayor es la capacidad de solubilización del SUPRAS.<sup>126</sup> Los disolventes con nanoestructuras en las que las moléculas de tensioactivo se agregan con un mayor grado de empaquetamiento son las que proporcionan disolventes con mayor concentración de anfífilo y, por tanto, con mayor número de centros de solubilización.

El tipo de interacciones que proporciona un SUPRAS para la solubilización de sustancias químicas viene determinado por la estructura química del anfífilo. Todos los compuestos anfífilos usados para sintetizar SUPRAS poseen una cadena hidrocarbonada y un grupo polar en su estructura, por lo tanto, pueden proporcionar interacciones de dispersión, dipolo-dipolo y dipolo-dipolo inducido para la solubilización de sustancias químicas en el SUPRAS. Los anfífilos que poseen además grupos cargados, pueden proporcionar interacciones electrostáticas, y si estos grupos son catiónicos, interacciones  $\pi$ -catión con sustancias con anillos aromáticos. Finalmente, si poseen grupos dadores o aceptores de protones, pueden formar enlaces por puentes de hidrógeno.

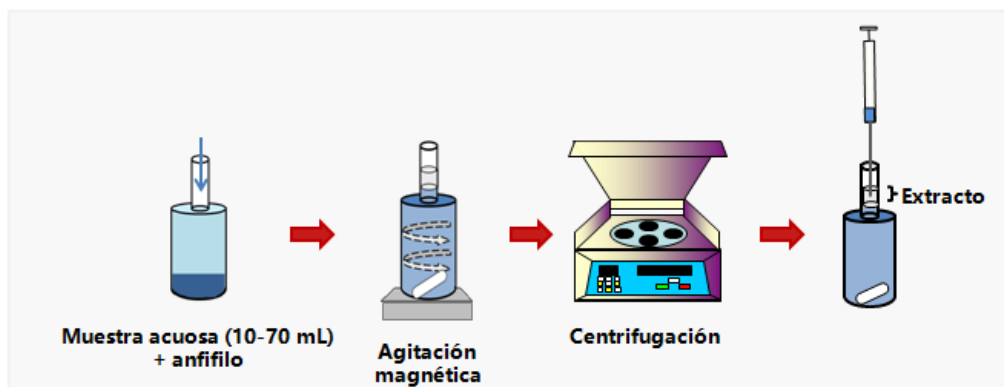
Todos los disolventes supramoleculares presentan una elevada capacidad de extracción de compuestos apolares, aumentando la eficacia de extracción a medida que aumenta la hidrofobicidad del soluto. Este comportamiento es similar al observado para la extracción con disolventes orgánicos y, por lo tanto, las constantes de distribución octanol-agua pueden utilizarse como guía para predecir la eficacia de los SUPRAS para extraer solutos orgánicos apolares. La capacidad de los SUPRAS para solubilizar compuestos polares e iónicos está muy influenciada por la naturaleza de los grupos polares e iónicos del analito y del anfífilo y del tipo de interacciones que se establecen entre ellos. Así por ejemplo, los SUPRAS constituidos por anfífilos con capacidad para formar puentes de hidrógeno son los más adecuados para extraer solutos polares que poseen grupos dadores y/o aceptores de protones y dentro de éstos, los que se forman a temperaturas moderadas son los que proporcionan mayores eficacias de extracción. Las temperaturas elevadas desfavorecen la formación de puentes de hidrógeno, reduciendo la capacidad de extracción del SUPRAS. Por lo tanto, cuando se utilizan SUPRAS de tensioactivos no iónicos polioxietilados una adecuada optimización de la temperatura de trabajo es clave para alcanzar su máxima capacidad de extracción de compuestos con grupos dadores y/o aceptores de hidrógeno. Los SUPRAS de ácidos alquilcarboxílicos y alcoholes se forman a temperatura ambiente y también poseen grupos polares con capacidad para formar puentes de hidrógeno, por lo que son especialmente adecuados para extraer compuestos con grupos dadores y/o aceptores de hidrógeno.

#### 4.5. APLICACIONES EN PROCESOS DE EXTRACCIÓN

El uso de disolventes supramoleculares en procesos de extracción analítica fue descrito por primera vez por Watanabe y colaboradores en la década de los sesenta.<sup>167,168</sup> Estos investigadores utilizaron disolventes de tensioactivos no iónicos polietoxilados para extraer diferentes sustancias químicas de muestras acuosas, denominando a este proceso "*cloud point extraction (CPE)*". Durante décadas las aplicaciones de la extracción con disolventes

supramoleculares se han circunscrito al uso de este tipo de disolventes,<sup>157</sup> pero en los últimos años, el desarrollo de nuevos disolventes de tensioactivos iónicos y de disolventes formados a partir de disoluciones vesiculares y micelares inversas en disoluciones hidroorgánicas ha ampliado enormemente el campo de aplicación de esta técnica de extracción,<sup>154</sup> que en la actualidad se encuentra en plena expansión.

Independientemente del SUPRAS usado, en un proceso típico de extracción para muestras líquidas, el disolvente supramolecular se genera en la propia muestra adicionando una cantidad adecuada de anfífilo y estableciendo las condiciones experimentales requeridas para la coacervación (Fig. 4.9). El disolvente supramolecular espontáneamente formado se dispersa mediante agitación magnética para favorecer la extracción de los analitos y, posteriormente, se separa mediante centrifugación. Los volúmenes de muestra y de disolvente supramolecular usados en este proceso son del orden de los mL y  $\mu$ L, respectivamente. Por lo tanto, la extracción con disolventes supramoleculares se puede considerar una variante de microextracción líquida-líquida dispersiva en la que el disolvente usado como extractante, a pesar de ser inmiscible con la muestra, se dispersa fácilmente en ésta sin necesidad de adicionar un segundo disolvente que actúen como agente dispersante.

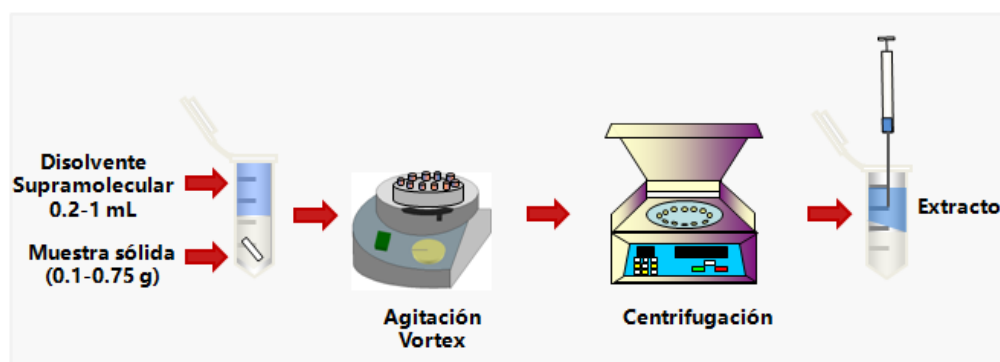


**Figura 4.9.** Procedimiento de extracción con disolventes supramoleculares de muestras líquidas con generación "in situ" del SUPRAS.

Recientemente se ha propuesto el uso de SUPRAS como alternativa a los disolventes orgánicos en microextracción en una gota (single drop microextraction, SDME),<sup>169</sup> microextracción basada en la solidificación de una gota flotante (microextraction base on solidification of floating droplet, ME-SFD)<sup>170</sup> y microextracción en fase líquida en fibra hueca (hollow fiber-liquid phase microextraction, HFLPME).<sup>171</sup> El uso de SUPRAS permite extender el

uso de estas técnicas a la determinación analitos polares que no son extraídos eficazmente en los disolventes orgánicos apolares tradicionalmente usados como fases extractantes. Finalmente, también se han usado los SUPRAS en combinación con nanopartículas magnéticas en la técnica denominada microextracción en fase sólida magnética dispersiva (magnetic dispersive microsolid phase extraction, MD- $\mu$ SPE).<sup>172-174</sup> El líquido magnético usado como extractante se separa de la muestra líquida con la ayuda de un imán y la recuperación de los analitos se realiza disolviendo el extracto molecular en un pequeño volumen de disolvente.

En cuanto a la extracción de muestras sólidas se puede realizar formando el disolvente supramolecular en una disolución en contacto con la muestra<sup>175</sup> o usando un SUPRAS previamente sintetizado.<sup>176,177</sup> La principal diferencia entre las dos modalidades estriba en que en la primera el analito se distribuye entre la fase en equilibrio y el SUPRAS, mientras que en la segunda el analito se incorpora directamente en los agregados que constituyen el SUPRAS. Esta segunda modalidad se ha utilizado con éxito para la extracción de compuestos polares, pero hasta la realización de esta Tesis no se había ensayado para la extracción de analitos apolares, los más fuertemente retenidos en determinadas muestras sólidas como suelos y sedimentos. El procedimiento seguido para realizar la extracción cuando se utiliza generación "in situ" del SUPRAS es similar al utilizado para la extracción de muestras líquidas, usando agitación magnética para favorecer la extracción. Sin embargo, cuando se realiza la generación del SUPRAS "ex situ" la agitación usada es tipo Vortex (Figura 4.10). La cantidad de muestra utilizada varía entre 0,1 y 1 g y los volúmenes de disolvente supramolecular son del mismo orden que los utilizados en la extracción de muestras líquidas.



**Figura 4.10.** Procedimiento de extracción con disolventes supramoleculares de muestras sólidas con generación "ex situ" del SUPRAS.



En la Tabla 4.3 se muestran algunas aplicaciones representativas de SUPRAS sintetizados usando diferentes inductores de la coacervación. La extracción con SUPRAS se ha utilizado principalmente en combinación con cromatografía de líquida con detección fotométrica, fluorimétrica y espectrometría de masas. Los extractos que contienen los analitos generalmente se inyectan directamente en el cromatógrafo de líquidos. Cuando se usan fases móviles con un alto porcentaje de disolvente orgánico, el tensioactivo que forma el SUPRAS se solubiliza rápidamente en la fase móvil destruyéndose la nanoestructura del disolvente, pero en fases móviles con alto contenido en agua (>40%), los agregados supramoleculares se destruyen lentamente formándose una pseudofase en el sistema cromatográfico donde los analitos pueden solubilizarse, lo que puede afectar a la resolución cromatográfica.

Respecto al sistema de detección, los SUPRAS constituidos por tensioactivos sin grupos cromóforos son los más adecuados para su uso con detectores fotométricos y fluorimétricos. Cuando la detección se realiza mediante espectrometría de masas, los anfifilos que forman el SUPRAS se dirigen hacia el desecho después de la separación cromatográfica con el fin de evitar la contaminación de la fuente de ionización.

**Tabla 4.3.** Aplicaciones de la extracción con disolventes supramoleculares en procesos analíticos.

Tensioactivo	Condiciones Experimentales	Tipo de analito	Muestra	Ref.
<i>SUPRAS inducidas por Temperatura</i>				
Triton X-114	35 °C	Fármacos	Plasma humano y saliva	178
	NaCl 7% (p/v), 45°C	Pesticidas	Frutas	139
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,4M, 45°C	Disruptores endocrinos	Aguas residuales	179
	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> 18% (p/v), NaCl 3% (p/v), 50°C	Pesticidas	Aguas naturales y suelos	180
Triton X-114 y dodecilsulfato sodico (SDS)	NaCl 0,2M, 60°C	Filtros de radiación UV	Agua de mar y aguas residuales	181
	NaCl 5 % (p/v), temperatura ambiente.	Pesticidas	Aguas naturales	182
	KCl 1,0M, 70°C	Colorantes	Recubrimiento de chicles y muestras dulces	183
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2M, 40°C	Explosivos	Aguas naturales	184
<i>SUPRAS inducidas por agua</i>				
Ácido Decanoico	THF 10% (v/v), pH 2	Hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs)	Aguas superficiales y residuales	185
	THF 5% (v/v), pH 2	Micotoxinas	Vino	186
	THF 10% (v/v), pH 2	Disruptores endocrinos	Verduras enlatadas y frutas	187

**Tabla 4.3** Continuación.

Tensioactivo	Condiciones Experimentales	Tipo de analito	Muestra	Ref.
<i>SUPRAS inducidos por agua</i>				
Ácido Dodecanoico	THF 12% (v/v), pH 1,5	Pesticidas	Aguas naturales	188
1-Decanol	THF 10% y H <sub>2</sub> O 86,25%	Disruptores Endocrinos	Sedimentos	189
	THF 10% and H <sub>2</sub> O 60%	Disruptores endocrinos	Comida enlatada	190
<i>SUPRAS inducidos por Ácidos</i>				
Dodecanosulfonato de sodio (SDoS)	HCl 4 M	Hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs)	Aguas naturales	191
	HCl 5,4 M	Pesticidas	Agua potable y de lago	192
Dodecilsulfato sodico (SDS)	HCl 5,4 M	Pesticidas	Agua de grifo , de lago, cerveza y orina humana	140
<i>SUPRAS inducidos por Contraiones orgánicos</i>				
Ácido decanoico: decanoato 1:1	Bu <sub>4</sub> NOH 0,37 % (p/v) y Bu <sub>4</sub> NCl 50 mM	Pesticidas	Ríos y aguas subterráneas	193
	Bu <sub>4</sub> NOH 1,95% (p/v)	Fenoles	Agua residual, agua superficial y aguas subterráneas	194

**Tabla 4.3** Continuación.

Tensioactivo	Condiciones Experimentales	Tipo de analito	Muestra	Ref.
<i>SUPRAS inducidos por Contralones orgánicos</i>				
Ácido decanoico: decanoato 1:1	Bu <sub>4</sub> NOH 2,9 mM, Bu <sub>4</sub> NBr 2,9 mM	Disruptores Endocrinos	Agua de río y agua residual	195
	Bu <sub>4</sub> NOH 0,37 % (p/v)	Pesticidas	Frutas y verduras	196
<i>SUPRAS inducidos por sales inorgánicas</i>				
Aliquat 336	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 75 mM	Toxinas	Aguas Naturales	27
Cetrimida	1-octanol 0,06% (p/v) y NaCl 4 g	Fenoles	Aguas Naturales	152

## REFERENCIAS

---

- <sup>1</sup> R. Petrucci, W. Harwood, G. Herring, Química General 8ª edición, Prentice hall (2008) 1088-1093.
- <sup>2</sup> R. Petrucci, W. Harwood, G. Herring, Química General 8ª edición, Prentice hall (2008) 1128-1130.
- <sup>3</sup> H. Murakami, Novel Optical Resolution Technologies 269 (2007) 273-299.
- <sup>4</sup> BSEF, 2003. Major brominated flame retardants volume estimates, 21 January 2003, Available from [www.bsef-site.com/docs/BFR\\_vols\\_2001.doc](http://www.bsef-site.com/docs/BFR_vols_2001.doc)., accessed February 12<sup>th</sup>, 2004.
- <sup>5</sup> Persistent Organic Pollutants Review Committee, 2011. Risk management evaluation on hexabromocyclododecane. UNEP/POPS/POPRC.7/19/Add.1.
- <sup>6</sup> M. Remberger, J. Sternbeck, A. L. Palm., K. Strömberg, E. Brorström-Lunden, Chemosphere 54 (2004) 9-21.
- <sup>7</sup> C. A. de Wit, D. Herzke, K. Vorkamp, Sci. Total Environ. 408 (2010) 2885-2918.
- <sup>8</sup> C. de Wit, M. Alaee, D. Muir, Organohalogen Compd. 66 (2004) 3811-3816.
- <sup>9</sup> G. Becher, Chemosphere 58 (2005) 989-991.
- <sup>10</sup> M. Peled, R. Scharia, D. Sondack, in: J. R. Desmurs, B. Féraud, M. J. Goldstein (Eds.), Advances in organobromine chemistry II, Elsevier, Amsterdam (1995) 92-99.
- <sup>11</sup> UNEP/POPS/POPRC.6/13/Add.2 Informe del comité de examen de los contaminantes orgánicos persistentes sobre la labor de su sexta reunión. Perfil de riesgos sobre el hexabromociclododecano.2010.
- <sup>12</sup> U. Sellström, A. Kierkegaard, C. de Wit, B. Jansson, Environ. Toxicol. Chem. 17 (1998) 1065-1072.
- <sup>13</sup> C. H. Marvin, G. T. Tomy, M. Alaee, G. MacInnis, Chemosphere 64 (2006) 268-275.

- 
- <sup>14</sup> S. Morris, C. R. Allchin, B. N. Zegers, J. J. Haftka, J. P. Boon, C. Belpaire, P. E. Leonards, S. P. Leeuwen, J. de Boer, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 5497-5504.
- <sup>15</sup> P. Leonards, D. Vethaak, S. Brandsma, C. Kwadijk, D. Micic, J. Jol, P. Schout, J. de Boer. Biotransformation of Polybrominated Diphenyl Ethers and Hexabromocyclododecane in Two Dutch Food Chains. In Proceedings of the Third International Workshop on Brominated Flame Retardants, BFR 2004, Toronto, Canada, 2004; pp 283-286, [www.bfr2004.com](http://www.bfr2004.com).
- <sup>16</sup> E. Eljarrat, A. de la Cal, D. Raldua, C. Duran, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 2603-2608.
- <sup>17</sup> U. Sellström, A. Bignert, A. Kierkegaard, L. Häggberg, C. de wit, M. Olsson, B. Jansson, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 5496-5501.
- <sup>18</sup> A. Covaci, AC. Gerecke, RJ. Law, S. Voorspoels, M. Kohler, HV. Heeb, H. Leslie, CR: Allchin, *Environ Sci Technol.* 40 (2006) 3679-3688.
- <sup>19</sup> CR. Allchin, S. Morris, *Organohalogen Compd.* 61 (2003) 41-44.
- <sup>20</sup> D. Ueno, M. Alae, C. Marvin, D. C.G. Muir, G. Macinnis, E. Reiner, *Environ. Pollut.* 144 (2006) 238-247.
- <sup>21</sup> J.J. Pigantello, B. Xing, Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 1-11.
- <sup>22</sup> ECHA/2008/02/SR4/ECA.226, Data on manufacture, import, export, uses and releases of HBCD as well as information on potential alternatives to its use.
- <sup>23</sup> Hexabromocyclododecane (HBCD) Action Plan, U. S. EPA 18/8/2010.
- <sup>24</sup> POPRC8.3.2013.<http://chm.pops.int/TheConvention/POPsReviewCommittee/ReportsandDecision/tabid/3309/Default.aspx>.
- <sup>25</sup> G.Tomy, T. Halldorson, R. Danell, K. Law, G. Arsenault, M. Alae, G. MacInnis, C. Marvin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 2819-2826.
- <sup>26</sup> N. Dodder, A. Peck, J. Kudlick, L. Sander, *J. Chromatogr. A* 1135 (2006) 36-42.

- 
- <sup>27</sup> K. Law, V. P. Palace, T. Halldorson, R. Danell, K. Wautier, B. Evans, L. Brinkworth, M. Alae, G. T. Tomy, Dietary accumulation of hexabromocyclododecane isomers in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), in: The Third international Workshop on Brominated Flame Retardants, Book of abstracts, Toronto, 2004, pp. 433-436.
- <sup>28</sup> K. Law, T. Halldorson, R. Daniell, V. P. Palace, K. Wautier, B. Evans, L. Brinkworth, M. Whittle, M. Alae, C. Marvin, Evidence of bioisomerization of  $\alpha$ -  $\gamma$ - hexabromocyclododecane (HBCD) isomers in fish in : The third International Workshop on Brominated Flame Retardants, Book of abstract, Toronto, 2004, pp. 383-386.
- <sup>29</sup> D. T. Szabo, J. J. Diliberto, H. Hakk, J. K. Huwe, L. S. Birnbaum, *Toxicol. Sci.* 121 (2011) 234-244.
- <sup>30</sup> M. A.-E. Abdallah, C. Uchea, J. K. Chipman, and S. Harrad, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 2732-2740.
- <sup>31</sup> H. Ming-Jing, L. Xiao-Jun, Y. Le-Huan, W. Jiang-Ping, C. She-Jun, M. Bi-Xian, *Environmen. Pol.* 179C (2013) 105-110.
- <sup>32</sup> M. A.-E. Abdallaha, S. Harradb, *Environ. Int.* 37 (2011) 443-448.
- <sup>33</sup> D. T. Szabo, J. J. Diliberto, H. Hakk, J. K. Huwe, L. S. Birnbaum, *Toxicol. Sci.* 117 (2010) 282-293.
- <sup>34</sup> C. Marvin, G. MacInnis, M. Alahee, G. Arsenault, G. Arsenault, G. Tomy, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 1925-1930.
- <sup>35</sup> K. Janák, A. Covaci, S. Voorspoels, G. Becher, *Organohalogen. Compd.* 66 (2004) 3913-3917.
- <sup>36</sup> H. Hühnerfuss, *Chemosphere* 40 (2003) 1918-1925.
- <sup>37</sup> H. De Geus, P. Wester, J. de Boer, U. Brinkman, *Chemosphere* 41 (2000) 725-727.
- <sup>38</sup> N.V Heeb, S.A. Wyss, B. Geueke, T. Fleischmann, H.-P.E Kohler, P. Lienemann, *Chemosphere* 107 (2014) 194-202.

- 
- <sup>39</sup> N.V. Heeb , D. Zindel, B. Geueke , H.-P.E. Kohler , P. Lienemann, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 6566-6574.
- <sup>40</sup> N.V. Heeb, D. Zindel, H. Graf, V. Azara, W. BerndSchweizer, B. Geueke, Chemosphere 90 (2013) 1911-1919.
- <sup>41</sup> A.C. Gerecke, W. Giger, P.C. Hartmann, N.V. Heeb, H.-P.E. Kohler, .P Schmid, Chemosphere 64 (2006) 311-317.
- <sup>42</sup> J.W. Davis, S.J. Gonsior, D.A. Markham, U. Friederich, R.W. Hunziker, J.M. Ariano, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 5395-5401.
- <sup>43</sup> V. P. Palace, K. Pleskach, T. Halldorson, R. Danell, K. Wautier, B. Evans, M. Alaei, C. Marvin, G. T. Tomy, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 1967-1972.
- <sup>44</sup> D. Crump, C. Egloff, S. Chiu, R. J. Letcher, S. Chu, S. W. Kennedy, Toxicol. Sci. 115 (2) (2010) 492-500.
- <sup>45</sup> X. Zhang, F. Yang, C. Xu, W. Liu, S. Wen, Y. Xu, Toxicol. In Vitro 22 (2) (2008) 1520-1527.
- <sup>46</sup> N. Lower, A. Moore. Mar. Freshw. Behav. Phy. 40 (4) (2007) 267-284.
- <sup>47</sup> [CMABFRIP] Chemical Manufacturers Association Brominated Flame Retardant Industry Panel. 1998. Hexabromocyclododecane (HBCD): A flow-through life-cycle toxicity test with the cladoceran (*Daphnia magna*). Easton (MD): Wildlife International, Ltd. Project No. 439A-108. 78pp.
- <sup>48</sup> [ACCBFRIP] American Chemistry Council Brominated Flame Retardant Industry Panel. 2003 a. Effect of hexabromocyclododecane on the survival and reproduction of the earthworm, *Eisenia fetida*. Columbia (MO) ABC Laboratories, Inc., Easton (MD): Wildlife International, Ltd. ABC Study No. 47222. 94pp.
- <sup>49</sup> [EU RAR] European Union Risk Assessment Report. 2008. Risk assessment Hexabromocyclododecane CAS No. 25637-99-4. Final Report May 20008 R044\_0805\_env\_hh\_final\_ECB.doc. Office for Official Publications of the European Communities. Available from: <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis>.



- 
- <sup>50</sup> S. Morris, P. Bersuder, C. R. Allchin, B. Zegers, J.P. Boon, P.E.G. Leonards, J. de Boer, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 343-349.
- <sup>51</sup> L. Setkova, J. Hajshova, P.A. Bergqvist, V. Kocourek, R. Kazda, P. Suchan, *J. Chromatogr. A* 1092 (2005) 150-181.
- <sup>52</sup> K. Janák, A. Covaci, S. Voorspoels, G. Becher, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 1987-1994.
- <sup>53</sup> R. Köppen, R. Becker, S. Esslinger, I. Nehls, *Chemosphere* 80 (2010) 1241-1245.
- <sup>54</sup> W. Hsin-Hung, C. Hsin-Chang, D. Wang-Hsien, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7755-7760.
- <sup>55</sup> G.T. Tomy, W. Budakowski, T. Halldorson, D.M. Whittle, M.J. Keir, C. Marvin, G. Macinnis, M. Alae, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2004) 2298-2303.
- <sup>56</sup> G.T. Tomy, K. Pleskach, R. Oswald, T. Halldorson, P.A. Helm, G. Macinnis, C.H. Marvin, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 3634-3639.
- <sup>57</sup> S. Gao, J. Wang, Z. Yu, Q. Guo, G. Sheng, J. Fu, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 2093-2099.
- <sup>58</sup> A.-H. Feng, S.-J. Chen, M.-Y. Chen, M.-J. He, X.-J. Luo, B.-X. Mai, *Mar. Pollut. Bull.* 64 (2012) 919-925.
- <sup>59</sup> Y. Zhang, Q. Li, Y. Lu, K. Jones, A. J. Sweetman, *Chemosphere* 148 (2016) 504-510.
- <sup>60</sup> W. Budakowski, G. Tomy, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1399-1404.
- <sup>61</sup> E. Eljarrat, P. Gerra, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 847-861.
- <sup>62</sup> J. Szejtli, T. Osa, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol 3 Cyclodextrin, Pergamon, Oxford, UK, (1997).
- <sup>63</sup> B. Gómara, R. Lebrón-Aguilar, J. E. Quintanilla-Lopez, M.J. Gonzalez, *Anal. Chem. Acta* 605 (2007) 53-60.
- <sup>64</sup> P. Guerra, E. Eljarrat, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1203 (2008) 81-87.
- <sup>65</sup> Química orgánica básica y aplicada de la molécula a la industria (1995), Universidad Politécnica de Valencia, Editorial Reverté, Eduardo Primo Yúfera Tomo II, cap. 45, 1167-1170.

- 
- <sup>66</sup> G. W. Ware, D. M. Whitacre, *An Introduction to Insecticides, the Pesticide Book*, 4<sup>th</sup> ed., MeisterPro Information Resources, Ohio, 2004.
- <sup>67</sup> N. George, M.Kalyanasundaram, *J. Sci. Ind. Res.* 53 (1994) 933-945.
- <sup>68</sup> V. Pérez-Fernández, M. A. García, M. L. Marina, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 968-989.
- <sup>69</sup> J. You, W. Lao, G. Wan, *Anal. Test Ttech. and Instr.* 7 (2) (2001) 100-104.
- <sup>70</sup> T. O'Mahony, S. Moore, B. Brosnan, J.D. Glennon, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 83 (2003) 681-691.
- <sup>71</sup> D. Mueller-Beilschmidt, *J. Pest. Reform.* 10 (1990) 32-38.
- <sup>72</sup> Ch. S. Wong, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 544-558.
- <sup>73</sup> J. Laufer, M. Pelhate, D. B.Sattelle, *Pest. Sci.* 16 (1985) 651-661.
- <sup>74</sup> International Program on Chemical Safety. (1990). *Environmental Health Criteria* 94, Permethrin. Pyrethrins. I. Series. WA 240: NLM Classification. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc94.htm>. Accessed 30 January 2020.
- <sup>75</sup> W. Liu, J. Gan, S. Lee, I. Werner, *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (2005) 1861-1866.
- <sup>76</sup> W. Liu, J.J. Gan, S. Qin, *Chirality* 17 (2005) S 127-133.
- <sup>77</sup> T. L. Liu, Y. S. Wang, J.H. Yen, *J. Food Drug Anal.* 12 (2005) 357-360.
- <sup>78</sup> C. Xu, J. Wang, W. Lui, D.G. Sheng, Y. Tu, Y. Ma, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 174-181.
- <sup>79</sup> A. Williams, *Pest. Sci.* 46 (1996) 3-9.
- <sup>80</sup> W. Lui, S. Qin, J. Gan, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3814-3820.
- <sup>81</sup> Z. Chen, Y. Wang, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 367-395.
- <sup>82</sup> W. Leicht, R. Fuchs, M. Londershausen, *Pestic. Sci.* 48 (1996) 325-332.
- <sup>83</sup> R. J. Marguire, *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 1613-1617.

- 
- <sup>84</sup> H. Perschke, M. Hussain, J. Agric. Food Chem. 40 (1992) 686-690.
- <sup>85</sup> L.O. Ruzo, V. V. Krishnamurthy, J. E. Casida, J. Agric. Food Chem. 25 (1977) 1385-1394.
- <sup>86</sup> DataPool: <https://www.eurl-pesticides-datapool.eu/>
- <sup>87</sup> Toxicology data network (TOXNET). <http://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/delta-methrin>.
- <sup>88</sup> Artículo 43, artículo 114, artículo 168, apartado 4, y artículo 169 del Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea (TFUE).
- <sup>89</sup> Reglamento (CE) n° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Disponible en <http://data.europa.eu/eli/reg/2002/178/oj>.
- <sup>90</sup> EU Búsqueda residuos de pesticidas. Disponible en <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=ES>.
- <sup>91</sup> Reglamento (CE) n° 396/2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. Diario oficial de la Unión Europea L 70 de 16/3/2005. Disponible en <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/396/oj>.
- <sup>92</sup> EU Pesticides database. Disponible en <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=ES>.
- <sup>93</sup> RASFF - Food and Feed Safety Alerts: [https://ec.europa.eu/food/safety/rasff\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en).
- <sup>94</sup> E. Enz, E. Pombo-Villar, Biochem. Pharmacol. 54 (1997) 321-323.
- <sup>95</sup> M. Shishovska, V. Trajkovska, Chirality 22 (2010) 527-533.
- <sup>96</sup> C. Cox, J. Pest. Ref. 18 (1998) 1-26.
- <sup>97</sup> R. A. Chapman, J. Chromatogr. 258 (1983) 175-182.

- 
- <sup>98</sup> P. E. Burt, M. Elliot, A. W. Farnham, N. F. Janes, P. H. Needham, D. A. Pulman, *Pest. Sci.* 5 (1974) 791-799.
- <sup>99</sup> D. Shea, V. Penmetsa, R. B. Leidy, *J. AOAC int.* 81 (1999) 1550-1561.
- <sup>100</sup> M. Elliot, A. W. Farnham, N. F. Janes, D. M. Soderlund, *Pest. Sci.* 9 (1978) 112-116.
- <sup>101</sup> K. Nishi, H. Huang, S. Kamita, I. Kim, C. Monsseau, B. Hammock *Arch. Biochem. Biophys.* 445 (2005) 115-123.
- <sup>102</sup> Q. Wang, J. Qiu, W. Zhu, G. Jia, L. Junling, Z. Zhou, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 721-726.
- <sup>103</sup> Z. Abdulhamid, B. E. Agbaji, C. E. Gimba, A. S. Agbaji, *IOSR J. Environ. Sci. Tox. Food Techn.* (IOSR-JESTFT) 9 (2015) 14-20.
- <sup>104</sup> M. Li, M. K. Morgan, S. E. Graham, J. M. Starr, *Talanta* 151 (2016) 42-50.
- <sup>105</sup> A. P. Vonderheide, B. Boyd, A. Ryber, E. Yilmaz, T. E. Hieber, P. E. Kauffman, S. T. Garriss, J. N. Morgan, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4633-4640.
- <sup>106</sup> Y. Zhang, D. Hu, S. Zeng, P. Lu, K. Zhang, L. Chen, B. Song, *Biomed. Chromatogr.* 30 (2016) 142-148.
- <sup>107</sup> R. Salghi, G. Luis, C. Rubio, A. Hormatallah, L. Bazzi, A. J. Guitierrez, A. Hardisson, *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 88 (2012) 358-361.
- <sup>108</sup> Zhang, S.; Yang, Q.; Yang, S.; Wang, W.; Li, Z.; Zhang, L.; Wand, Ch.; Wang, Z. A. *Talanta*, 2017, 166, 46-53.
- <sup>109</sup> Wang, K.; Xie, X.; Zhang, Y.; Huang, Y.; Zhou, S.; Zhang, W.; Lin, Y. *Food Chem.* 2018, 240, 1233-1242.
- <sup>110</sup> R. E. Hunter, A. M. Riederer, P. B. Ryan, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 1396-1402.
- <sup>111</sup> A. Mekebri, D. B. Crane, G. J. Blondina, D. R. Oros, J. L. Rocca, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80 (2008) 455-460.

- 
- <sup>112</sup> W. G. Taylor, D. D. Vedres, J.L. Elder, *J. Chromatogr.* 645 (1993) 303-310.
- <sup>113</sup> Z. Y. Li, Z. C. Zhang, L. Zhang, L. Leng, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80 (2008) 335-339.
- <sup>114</sup> F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani, *J. Chromatogr. A* 906 (2004) 35-50.
- <sup>115</sup> S. G. Lisseter, S. G. Hambling, *J. Chromatogr.* 539 (1991) 207-210.
- <sup>116</sup> G. R. Gayley, B. W. Simpson, *J. Chromatogr.* 356 (1986) 123-134.
- <sup>117</sup> G. S. Yan, P. Parrilla-Vazquez, A. Garrido-Frenich, J. L. Martinez-Vidal, H. Y. Aboul-Enein, *Chromatographia* 60 (2004) 523-526.
- <sup>118</sup> A. Karcher, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 18 (1997) 1173-1179.
- <sup>119</sup> Y. Nishikawa, *Anal. Sci.* 9 (1993) 33-37.
- <sup>120</sup> L.O. Ruzo, V. V. Krishnamurthy, J. E. Casida, K. Gohre, *J. Agric. Food Chem.* 35 (1987) 879-883.
- <sup>121</sup> J. Ye, J. Wu, W. Liu, *Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 1148-1163.
- <sup>122</sup> X. Hou, M Han, X.H. Dai, X.F. Yang, S. Yi, *Food Chem.* 138 (2013) 1198-1205.
- <sup>123</sup> L. Weiping, J.J. Gan, *J. Agric. and Food Chem.* 52 (2004) 736-741.
- <sup>124</sup> IUPAC Compendium of Chemical Terminology 31 (1975) 611.
- <sup>125</sup> J.N. Israelachvili, D.J. Mitche., B.W. Ninham, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 72 (1976) 1525-1568.
- <sup>126</sup> A. Ballesteros-Gómez, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta*, 677 (2010) 108-130.
- <sup>127</sup> J. W. Steed, D.R. Turner, K. J. Wallece, *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*. John Wiley & Sons , Chichester, 2007.
- <sup>128</sup> J. M. Lehn, Toward complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 4763-4768.

- 
- <sup>129</sup> B. Moreno Cordero; J.L. Pérez Pavón, García Pinto; M.E. Fernández-Laespada, *Talanta* 40 (1993) 1703-1710.
- <sup>130</sup> T. Saitoh; W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2520-2525.
- <sup>131</sup> P. Taechangam; J.F. Scamehorn, S. Osuwan; T. Rirksomboon, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 347 (2009) 200-209.
- <sup>132</sup> H.J. Schott, *Colloid Interface Sci.* 260 (2003) 219-224.
- <sup>133</sup> T. Inoue; H.J. Ohmura, *Colloid Interf. Sci.* 258 (2003) 374-382.
- <sup>134</sup> T. Gu; P.A. Galera-Gómez, *Colloids Surf. A: Physicochem Eng. Aspects* 104 (1995) 307-312.
- <sup>135</sup> F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473-7484.
- <sup>136</sup> A. Ballesteros, S. Rubio, *Anal. Chem.* 84 (2012) 342-349.
- <sup>137</sup> I. Casero; D. Sicilia; S. Rubio.; D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4519-4526.
- <sup>138</sup> D. Sicilia; S. Rubio; D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 13-22.
- <sup>139</sup> A. Santalad, S. Srijaranai, R. Burakham, J.D. Glennon, R.L. Deming, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1307-1317.
- <sup>140</sup> G. Jia, L. Li, J. Qiu, X. Wang, W. Zhu, Y. Sun, Z. Zhou, *Spectrochim. Acta Part A* 67 (2007) 460-464.
- <sup>141</sup> I. Y. Goryacheva, S. N. Shtykov, A. S. Loginov, I. V. Panteleeva, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1413-1418.
- <sup>142</sup> D. K. Rout, S. Chauhan, A. Agarwal, *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 (2009) 8842-8847.
- <sup>143</sup> S. Kumar, D. Sharma, Z. A. Khan, K. –ud-Din, *Langmuir* 18 (2001) 4205-4209.
- <sup>144</sup> S. Kumar, D. Sharma, K. –ud-Din, *J. Surfact. Deterg.* 7 (2004) 271-275.
- <sup>145</sup> P. Yan, J. Huang, R. C. Lu, C. Jin, J. X. Xiao, Y. M. Chen, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 5237-5242.

- 
- <sup>146</sup> G. C. Kalur, S. R. Raghavan, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 8599-8604.
- <sup>147</sup> D. Garenne, L. Navailles, F. Nallet, A. Grélard, E. J. Dufourc, J. P. Douliez, *J. Colloid interf. Sci.* 468 (2016) 95-102.
- <sup>148</sup> S. R. Raghavan, H. Edlund, E. W. Kaler, *Langmuir* 18 (2002) 1056-1064.
- <sup>149</sup> P. Mukherjee, S. K. Padhan, S. Dash, S. Patel, B. K. Mishra, *Adv. Colloid interf. Sci.* 162 (2011) 59-79.
- <sup>150</sup> F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7229-7239.
- <sup>151</sup> X. Jin, M. Zhu, E. D. Conte, *Anal. Chem.* 71 (1999) 514-517.
- <sup>152</sup> B. K. W. Man, M. H. W. Lam, P. K. S. Lam, R. S. S. Wu, G. Sahw, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 3985-3990.
- <sup>153</sup> N. Feizi, Y. Yamini, M. Moradi, M. Karimi, Q. Salamat, *Anal. Chim. Acta* 953 (2017) 1-9.
- <sup>154</sup> C. Caballo, M. D. Sicilia, S. Rubio. *Supramolecular solvents for Green Chemistry En "The application of green solvent in separation processes"* . Elsevier (2017) 111-137.
- <sup>155</sup> P. Taechangam, J.F. Scamehorn, S. Osuwan, T. Rirksomboon *Colloids Surf. A* 347 (2009) 200-209.
- <sup>156</sup> B. Yao, L. Yang, *J. Colloid Interf. Sci.* 319 (2008) 316-321.
- <sup>157</sup> R. Carabias, E. Martinez, B. Rodriguez-Gonzalo, J.L. Moreno-Cordero, C. Perez-Pavón, E. García-Pinto, M.E. Fernandez-Laespada, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 251-265.
- <sup>158</sup> M.J. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 3rd edition, John Wiley and Sons Ltd., Hoboken, 2004, p 197.
- <sup>159</sup> K. Materna, J. Szymanowski, *J. Colloid Interf. Sci.* 255 (2002) 195-201.
- <sup>160</sup> E.A. Safanova, T. Mehling, S. Storm, E. Ritter, I.V. Smirnova, *Chem. Eng. Res. Des.* 92 (2014) 2840-2850.
- <sup>161</sup> M.K. Purkait, S. Dasgupta, S. De, J. Harzard. *Mater. B* 137 (2006) 827-835.

- 
- <sup>162</sup> M.K. Purkait, S. Banerjee, S. Mewara, S. DaGupta, S. De, *Water Res.* 39 (2005) 3885-3890.
- <sup>163</sup> A. Bernheim-Groswater, E. Wachtel, Y. Talmon, *Langmuir* 16 (2000) 4131-4140.
- <sup>164</sup> S. Ezrahi, E. Tuval, A. Aserin, *Adv. Colloid Interf. Sci.* 128-130 (2006) 77-102.
- <sup>165</sup> R.D. Koehler, S.R. Raghavan, E.W. Kaler, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 11035-11044.
- <sup>166</sup> R. Ana, J. Schmidt, Y. Talmon, *Langmuir* 21 (2005) 11628-11636.
- <sup>167</sup> H. Ishii, J. Miura, H. Watanabe, *Bunseki Kagaku* 28 (1977) 252-256.
- <sup>168</sup> H. Watanabe, H. Tanaka, *Talanta* 25 (1978) 585-589.
- <sup>169</sup> F.J. López-Jimenez, S. Rubio, D. Pérez Bendito, *J. Chromatogr. A* 1195 (2008) 25-33.
- <sup>170</sup> M. Moradi, Y. Yamini, *J. Chromatogr. A* 1229 (2012) 30-37.
- <sup>171</sup> M. Moradi, Y. Yamini, F. Rezaei, E. Tahmasebi, A. Esrafil, *Analyst* 137 (2012) 3549-3557.
- <sup>172</sup> D.L. Giokas, Zhu, Q. Pan, A. Chilvert, *J. Chromatogr. A* 1251 (2012) 33-39.
- <sup>173</sup> N. Gao, H. Wu, Y. Chang, X. Guo, L. Zhang, L. Du, Y. Fu, *Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 134 (2015) 10-16.
- <sup>174</sup> P. Zohrabi, M. Shamsipur, M. Hashemi, B. Hashemi, *Talanta* (2016) 340-346.
- <sup>175</sup> A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta* 650 (2009) 207-213.
- <sup>176</sup> E. M. Costi, M. D. Sicilia, S. Rubio, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1447-1454.
- <sup>177</sup> E. M. Costi, M. D. Sicilia, S. Rubio, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6250-6257.
- <sup>178</sup> M.D. Rukhadze, S.K. Tsagareli, N.S. Sidamonidze, V.R. Meyer, *Anal. Biochem.* 287 (2000) 279-283.
- <sup>179</sup> H. Abdollahi, L. Bagheri, *Anal. Chim. Acta* 514 (2004) 211-218.



- 
- <sup>180</sup> L. Wang, Y.-Q. Cai, B. He, C.-G. Yuan, D.-Z. Shen, J. Shao, G.-B. Jiang, *Talanta* 70 (2006) 47-51.
- <sup>181</sup> Zhou, J. Chen, Y. Cheng, D. Li, F. Hu, H. Li, *Talanta* 79 (2009) 189-193.
- <sup>182</sup> A.R. Zarei, *Anal. Biochem.* 369 (2007) 161-167.
- <sup>183</sup> N. Pourreza, M. Zareian, *J. Hazard. Mater.* 165 (2009) 1124-1127.
- <sup>184</sup> S. Babaei, A. Beiraghi, *Anal. Chim. Acta* 662 (2010) 9-13.
- <sup>185</sup> A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1203 (2008) 168-176.
- <sup>186</sup> S. Garcia-Fonseca, A. Ballesteros Gomez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 3-10.
- <sup>187</sup> A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 51-58.
- <sup>188</sup> C. Caballo, M. D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta* 761 (2013) 102-118.
- <sup>189</sup> F.J. López-Jiménez, M. Rosales-Marcano, S. Rubio, *J. Chromatogr. A* 1303 (2013) 1-8.
- <sup>190</sup> A. Alabi, N. Caballero-Casero, S. Rubio, *J. Chromatogr. A*, 1336 (2014) 23-33.
- <sup>191</sup> D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, N. Maniasso, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 29-38.
- <sup>192</sup> G. Jia, C. Bi, Q. Wang, J. Qiu, W. Zhou, Z. Zhou, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1423-1427.
- <sup>193</sup> A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3740-3745.
- <sup>194</sup> F.J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1195 (2008) 25-33.
- <sup>195</sup> F.J. Ruiz, S. Rubio and D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 269-276.
- <sup>196</sup> A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta* 650 (2009) 207-213.

**PARTE EXPERIMENTAL:  
MICROEXTRACCIÓN  
SUPRAMOLECULAR EN  
ANÁLISIS QUIRAL  
MEDIAMBIENTAL Y DE  
ALIMENTOS**



# **Capítulo 1**

---

## **Análisis quiral de muestras medioambientales**





Analytica Chimica Acta  
Volume 1027, 16 October 2018, Pages 47-56



## **SPEEDING UP THE EXTRACTION OF HEXABROMOCYCLO- DODECANE ENANTIOMERS IN SOILS AND SEDIMENTS BASED ON HALOGEN BONDING**

A. B. Lara, C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio

*Department of Analytical Chemistry, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, University of Córdoba,  
Edificio Anexo Marie Curie, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain*

### **ABSTRACT**

Halogen bonding (XB), a highly energetic and directional interaction, is here proposed as a new mechanism to increase solute solubilisation in solvent extractions. The approach is illustrated by the extraction of hexabromocyclododecane (HBCD) enantiomers in soils and sediments using supramolecular solvents (SUPRAS) containing XB donors in their structure. SUPRAS consisting of inverted hexagonal aggregates of decanoic acid, synthesized by water-induced coacervation of the amphiphile in tetrahydrofuran (THF), were explored for this purpose. Sample treatment involved the extraction of 400 mg of soil or sediment with 250  $\mu\text{L}$  of SUPRAS for 5 min and then centrifugation for 10 min. SUPRAS extracts were directly analysed by chiral liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and quantification was carried out using isotopically labelled internal standards. Quantitative recoveries (93-102%) were obtained for the six HBCD enantiomers in both fresh and aged spiked samples. The mild experimental conditions required for extraction (room temperature and atmospheric pressure), the low SUPRAS volume/sample amount ratio needed (0.6 mL  $\text{g}^{-1}$ ), the short time required for sample treatment (15 min), and the simplicity of the procedure (use of conventional equipment and the possibility of treating several samples simultaneously), makes this method clearly superior to those previously reported. Method quantitation limits were in the intervals 0.58-2.23 ng  $\text{g}^{-1}$ , and the relative standard deviations

( $n=18$ , HBCD stereoisomer concentration =  $50 \text{ ng g}^{-1}$ ) obtained under repeatability and reproducibility conditions varied within the ranges 1.0-4% and 2.5-5%, respectively. The approach here described could be easily extended to the extraction of brominated flame retardants in different types of matrices.

*Keywords:* Halogen bond, Supramolecular solvents, Chiral liquid chromatography/mass spectrometry, Hexabromocyclododecane enantiomers, Sediments, Soils.

## 1. INTRODUCTION

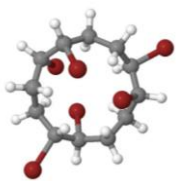
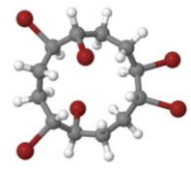
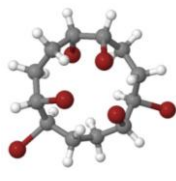
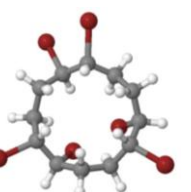
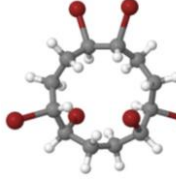
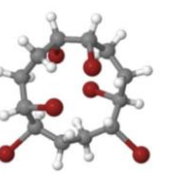
Halogen bonding (XB) has recently emerged as a promising noncovalent interaction to direct and control molecular assembly phenomena.<sup>1</sup> Excellent reviews covering computational studies on fundamental understanding of XB and its applications in crystal engineering, catalysis, drug design, biological systems and functional materials have been reported.<sup>2-5</sup> The scientific interest for XB is reflected in the growing number of papers per year having halogen bonding in the title (around 260 in 2017) and the specific symposiums held on this issue.<sup>5,6</sup>

XB is the general ability of covalently-bound halogen atoms to attractively interact with an electron-rich region of a neighbouring atom or molecule.<sup>7</sup> It can be described as  $R-X...D$ , where X is the electrophilic halogen atom (I, Br, Cl; Lewis acid); D is a donor of electron density (N, O, P, S, Se, Cl, Br, I, etc. Lewis base) and R is a carbon, nitrogen or halogen atom. The Lewis acidic role of X, despite its electronegativity, is explained by the anisotropic distribution of charge around the covalently bonded halogen atom. The effective atomic radius of the halogen along the extended R-X bond axis is shorter than in the directions perpendicular to it and this results in a region of positive electrostatic potential along the covalent bond, usually referred as the  $\sigma$ -hole.<sup>5</sup> Thus, halogens have the ability to function as both electrophilic (along R-X) and nucleophilic (along vectors perpendicular to R-X). The  $\sigma$ -hole increases in the order  $Cl < Br < I$ . No XB is expected for F due to its tightly bound electrons.<sup>8</sup>

The strong energies involved in XB (up to  $200 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) and its effective competition with hydrogen bonding in solution<sup>3</sup> makes XB highly promising in analytical applications. However, there has been limited research on this issue so far and, to the best of our knowledge, it has focused on two topics, namely, the use of XB as a new retention mechanism for the solid phase extraction (SPE) of perfluorinated iodoalkanes<sup>9</sup> and iodoperfluoroarenes,<sup>10</sup> and the utilization of XB for driving enantioseparations.<sup>11,12</sup>

This research was intended to take advantage of XB in solvent extractions. For this purpose we focused on the extraction of hexabromocyclododecane (HBCD), a brominated flame retardant (BFR) of high concern<sup>13,14</sup> due to their extensive use (around 28,000 tonnes per year),<sup>15</sup> long-range transport, high persistence and toxicity, and potential to bioaccumulate and biomagnify.<sup>16</sup> HBCD has been included in the list of persistent organic pollutants in the framework of the Stockholm Convention.<sup>17</sup>

**Table 1.** Octanol-water partition coefficients of the isomers  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD and three-dimension stereochemical structures of their two enantiomeric forms.

Isomer	Log $K_{o/w}$ <sup>a</sup>	Stereochemical structure <sup>b</sup>	
		(+)-Enantiomer	(-)-Enantiomer
$\alpha$ -HBCD	5.07 $\pm$ 0.09		
$\beta$ -HBCD	5.12 $\pm$ 0.09		
$\gamma$ -HBCD	5.5 $\pm$ 0.1		

<sup>a</sup>Obtained from Ref [19]

<sup>b</sup>Obtained from ChemIDplus Lite database.

Available from: <https://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp>

Atoms in stereochemical structures: C:  ; H:  ; Br: 

Commercial technical HBCD mainly consists of three diastereoisomers ( $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD, at the proportions 10-13%, 0.5-12% and 75-89%, respectively) composed of six enantiomers



[[(+)/(-)- $\alpha$ -, (+)/(-)- $\beta$ - and (+)/(-)- $\gamma$ -HBCD] (Table 1).<sup>18,19</sup> The strong adsorption of HBCD isomers to soils and sediments has been explained on the basis of their high hydrophobicity (log  $K_{ow}$  in the range 5.07-5.5) and the establishment of multiple dispersion interactions with the organic matter.<sup>20,21</sup> However, owing to the presence of XB acceptors (Lewis bases) in soils and sediments, we hypothesize that XB should contribute largely to retention of HBCD isomers in these matrices and that the use of solvents able to establish halogen bonds with them should speed up their extraction.

Most of the studies on the occurrence of HBCD in the environment deal with the quantification of total HBCD or the three diastereoisomers.<sup>22</sup> Determination of HBCD enantiomers, required for correct assessment of the environmental risk to this pollutant,<sup>23</sup> is carried out by  $\beta$ -cyclodextrin-based chiral liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).<sup>24-26</sup> The strong retention of HBCD to soils and sediments results in low extractability and it makes mandatory the use of Soxhlet,<sup>24,27,28,30</sup> pressurized liquid extraction, PLE<sup>22,29,30</sup> or microwave-assisted extraction (MAE),<sup>30</sup> to achieve acceptable recoveries (68-91%). Sample cleanup includes sulfur removal with activated copper<sup>24,27,28</sup> or tetrabutylammonium sulfite/propanol/water,<sup>30</sup> and SPE of the resulting extracts on multilayer silica/alumina,<sup>24,28</sup> sulfuric acid silica/neutral silica<sup>27</sup> or silica gel<sup>22</sup> columns. Evaporation of final extracts is mandatory in order to achieve adequate sensitivity. Both the volume of solvent required per sample (35-270 mL of mixtures of acetone/hexane or dichloromethane/hexane) and the time spent in sample treatment (25-2,880 min without taking into account sample evaporation) make these procedures inadequate for environmental studies, which require the analysis of a high number of samples within a reasonable time. Therefore, the development of simpler and faster sample treatments is a need.

This manuscript explores the potential benefits of using a solvent able to establish both halogen bond and dispersion interactions for the extraction of HBCD enantiomers in soils and sediments. For this purpose, supramolecular solvents (SUPRAS) were evaluated. The suitability of SUPRAS for the extraction of organic contaminants in environmental matrices has been widely proved,<sup>31</sup> but their potential to extract halogenated organic compounds solubilized in the solvent by halogen bonding has not been explored so far.

SUPRAS used in this study were synthesized by spontaneous self-assembly of decanoic acid in tetrahydrofuran-water media.<sup>32</sup> Molecules of decanoic acid in these SUPRAS arrange as inverted hexagonal aggregates in which water pools are surrounded by carboxylic groups and the hydrocarbon chains are dissolved in THF. Dispersion interactions with HBCD can be established in the hydrocarbon chains while halogen bonds can be established through the

oxygen atom of the C=O groups of the carboxylic acid, that has two lone electron pairs and can act as acceptor for one or two XBs, and THF, a mild Lewis base. The high concentration of decanoic acid in the SUPRAS ( $\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$ ) ensures multiple binding sites for HBCD, which should effectively compete with the interactions between HBCD and the organic matter in the targeted matrices, thus enhancing extraction yield. Below the most relevant results obtained in this study are presented and discussed.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Standards and reagents

All chemicals were of analytical reagent-grade and were used as supplied. Decanoic acid (DeA) was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Individual HBCD diastereoisomers ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) were supplied by Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) as racemic solutions in toluene ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ , 97% purity). The internal standards  $^{13}\text{C}_{12}$  HBCD diastereoisomers were obtained from Wellington Labs (Guelph, Canada), also as racemic solutions in toluene ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ , 98% purity). Working solutions ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) were prepared in methanol and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . They were stable for at least 3 months. LC-grade tetrahydrofuran (THF) was obtained from Panreac (Barcelona, Spain), and LC-grade water and LC/MS-grade acetonitrile and methanol were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.2. Apparatus

The LC-MS system used was a hybrid triple quadrupole/linear ion trap (Applied Biosystems MSD Sciex 4000QTRAP, Foster City, CA, USA) coupled to a liquid chromatograph Agilent HP 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with a TurbolonSpray (TIS) interface. All data were acquired and processed using the Analyst 1.5.1 Software. The separation of the HBCD enantiomers was performed on a chiral column Nucleodex  $\beta$ -PM ( $200 \text{ mm} \times 4.0 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) from Macherey-Nagel (Düren, Germany). A magnetic stirrer Basicmagmix from Ovan (Barcelona, Spain) and a digitally regulated centrifuge Mixtasel equipped with an angle rotor  $4 \times 100 \text{ mL}$  (ref. 7001326) from JP-Selecta (Abrera, Spain) were used for SUPRAS production. A lyophilizer EZ-DRY from FTS Systems Inc. (Stone Ridge, NY, USA), a vortex-shaker REAX Top equipped with an attachment (ref. 549-01000-00) for 10 microtubes from Heidolph (Schwabach, Germany) and a high speed brushless centrifuge MPW-350R equipped with an angle rotor  $36 \times 2.2/1.5 \text{ mL}$  (ref. 11462) from MPW Med-Instruments (Warszawa, Poland) were

used for sample preparation. An autoclave Presoclave II 30 from Selecta was utilized for sample sterilization.

## 2.3. Enantioselective determination of HBCD in sediments and soils

### 2.3.1. Collection, spiking and preservation of samples

Several sediment and soil samples were collected in the South of Spain. Sediments were taken at 0-5 cm depth from different streams, two of them (Guadajoz and Rabanales) flowing by Córdoba city and the others (Guadalquivir, Jándula and Rumblar) running through Andújar city. Soils were taken in two different places in the province of Córdoba at 0-10 cm in depth. Sediment and soil samples were air-dried at room temperature, and then they were freeze-dried at 50 mTorr and -45 °C for 24 h. The lyophilized material was grounded using an agate mortar and pestle, passed through a 2 mm sieve and stored at 4 °C under light protection until analysis.

Both fresh and aged fortified samples were prepared from air-dried sediment/soil. Before fortifying aged samples, they were sterilized in an autoclave using beakers sealed with Al foil and heated at 121 °C and 1.1 atm for 1 h on three different days. Spiking of samples was performed by addition of a methanolic solution containing the racemic  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD diastereoisomers (50  $\mu$ L per 100 mg of sample). The concentration of each enantiomer in the samples was in the interval 3-750 ng g<sup>-1</sup>. After standing at room temperature for 48 h for evaporation of methanol, the spiked samples were divided in two portions, one of which was moistened with LC-grade water (20 % v/w). Both dry and wet samples were immediately analysed (fresh fortified samples) or stored under dark conditions at 4°C for 90 or 180 days (aged fortified samples). Before analysis, fortified samples were air-dried, lyophilized, grounded and sieved, similarly to the non-fortified ones.

### 2.3.2. Synthesis of the SUPRAS

Decanoic acid-based SUPRAS was synthesized by dissolving DeA (6.5 g) in THF (4.2 mL) and mixing the resulting organic solution with 80 mL of a 10 mM hydrochloric acid aqueous solution in a 100 mL-glass centrifuge tube. The tube was sealed with parafilm to avoid THF evaporation and it was subjected to magnetic stirring for 5 min at 900 rpm. Then, the suspension formed was centrifuged at 3,500 rpm for 10 min to accelerate the separation of the SUPRAS from the hydro-organic solution. Next, the SUPRAS, at the top of the solution,

was withdrawn using a 10 mL-syringe, transferred to a hermetically closed storage glass vial to avoid THF losses and stored at 4 °C. Under these conditions, the solvent produced (-8.5 mL) was stable for at least one month and it was sufficient to treat 34 sediment/soil samples

#### 2.3.3. SUPRAS-based microextraction

About 400 mg of sediment or soil and 250  $\mu$ L of SUPRAS were mixed in a 2 mL-microtube Safe-Lock from Eppendorf Ibérica (Madrid, Spain). A micro Teflon-coated bar (3x10 mm) was introduced in the microtube to favour sample dispersion during extraction, which was made by vortex-shaken at 2,500 rpm for 5 min. Then, the mixture, thermostated at 10 °C, was centrifuged at 15,000 rpm for 10 min. An aliquot of 50  $\mu$ L of the supernatant was withdrawn using a microsyringe and placed in an autosampler glass vial with insert (c.a. 150  $\mu$ L capacity). Finally, 2  $\mu$ L of the methanolic IS solution (see Section 2.1) were added to the extract before subjecting it to LC-MS/MS analysis.

#### 2.3.4. Chiral LC-MS/MS determination of HBCD enantiomers

Separation and quantification of the six HBCD enantiomers was carried out using chiral LC coupled with a TurbolonSpray (TIS) interface, operating in the negative ion mode, to a hybrid triple quadrupole/linear ion trap analyzer, operating in the selected reaction monitoring (SRM) mode. The injection volume was 10  $\mu$ L. The mobile phase consisted of acetonitrile/methanol (70:30 v/v) (A) and water/methanol (70:30 v/v) (B). The elution program was as follows: linear gradient from 50:50 A:B to 90:10 A:B over the first 8 min, isocratic conditions 90:10 A:B through the next 10 min and then 100:0 A:B for 3 min. Reconditioning the column took about 10 min. The flow-rate of the mobile phase and the temperature of the stationary-phase column were kept at 0.3 mL min<sup>-1</sup> and 40°C, respectively. The diver valve was programmed to send the mobile phase containing DeA and the most polar matrix components to waste. The elution order for each enantiomer was assigned according to Janák et al.<sup>33</sup>

**Table 2.** Linearity and sensitivity parameters obtained for the determination of HBCD enantiomers.

HBCD enantiomers	Calibration parameters				MDL <sup>c</sup> (ng g <sup>-1</sup> )		MQL <sup>d</sup> (ng g <sup>-1</sup> )		
	Linear range (μg L <sup>-1</sup> )	Slope ± s x10 <sup>3</sup> (μg <sup>-1</sup> L)	Intercept ± s x10 <sup>3</sup>	R <sup>a</sup>	S <sub>xy</sub> <sup>b</sup> x10 <sup>3</sup>	Sediment	Soil	Sediment	Soil
(+)-α-HBCD	0.2-1200	2.39±0.03	-0.02±0.02	0.9998	0.20	0.22	0.28	0.75	0.93
(-)-α-HBCD	0.2-1200	2.27±0.02	0.02±0.01	0.99993	0.14	0.19	0.24	0.64	0.81
(+)-β-HBCD	0.2-1200	6.5±0.1	-0.05±0.09	0.9997	0.87	0.20	0.50	0.67	1.68
(-)-β-HBCD	0.2-1200	6.41±0.08	-0.05±0.05	0.9998	0.48	0.18	0.51	0.58	1.69
(+)-γ-HBCD	0.3-1200	2.83±0.05	0.01±0.03	0.9997	0.30	0.48	0.63	1.60	2.11
(-)-γ-HBCD	0.3-1200	2.90±0.09	0.06±0.06	0.9993	0.62	0.43	0.67	1.42	2.23

<sup>a</sup>Correlation coefficient<sup>b</sup>Standard error of the estimate<sup>c</sup>Detection and <sup>d</sup>quantitation limits of the method

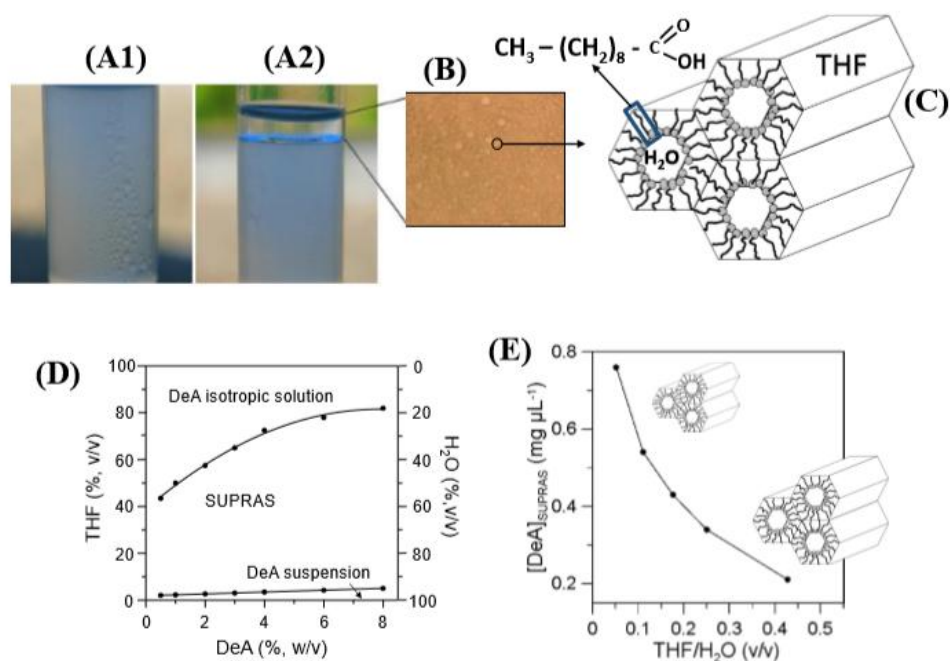
Identification and quantitation of HBCD enantiomers were performed by recording the  $[M-H]^- \rightarrow Br^-$  transitions at  $m/z$  640.9 $\rightarrow$ 78.9 (quantifier ion) and 640.9 $\rightarrow$ 80.9 (qualifier ion). The IS enantiomers were monitored at the  $m/z$  652.6 $\rightarrow$ 78.9 transition. The TIS interface parameters were fixed as follows: curtain and nebulizer gas, 50 psi; turbo gas, 10 psi; temperature of the turbo gas, 350 °C; ion spray voltage, -4,500 V; entrance potential, 10 V; and declustering potential, -85 V for analytes and -35 V for ISs. The analyzer settings were as follows: 1.0 unit resolution for the first and third quadrupoles; collision gas,  $3.0 \times 10^{-5}$  Torr; collision energy, -48, -32 and -72 V; and collision cell exit potential, -17, -7 and -1 V for the transitions 640.9 $\rightarrow$ 80.9, 640.9 $\rightarrow$ 78.9 and 652.6 $\rightarrow$ 80.9, respectively. Calibration curves were constructed from standard solutions in methanol containing the HBCD enantiomers over the ranges stated in Table 2 and a constant concentration of IS ( $100 \mu g L^{-1}$  of each enantiomer). The concentration of enantiomers in the extract were calculated from calibration curves obtained by plotting peak area ratios ( $A/A_{IS}$ ;  $A$  = peak area of individual enantiomer and  $A_{IS}$  = peak area of the corresponding IS) versus the amount of analyte injected.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Supramolecular solvent-based microextraction of HBCD enantiomers

##### 3.1.1. SUPRAS description and characteristics

Decanoic acid-based SUPRASs were selected in this study because of their ability to establish both dispersion interactions and halogen bonds with HBCD enantiomers. These SUPRASs are produced by coacervation of colloidal solutions of protonated decanoic acid in THF under addition of water, a poor solvent for the amphiphile.<sup>32</sup> Initially, oily droplets are produced in the bulk solution (Fig. 1A1) that separate from it as a new liquid phase (SUPRAS), less dense than water (Fig. 1A2). The coacervate droplets keep their integrity in the SUPRAS (Fig. 1B) where the decanoic acid shows an hexagonal arrangement (Fig. 1C).<sup>31,34</sup> HBCD-SUPRAS halogen bonds can be established through the two lone electron pairs of the oxygen atoms in both the amphiphile carbonyl groups and THF.



**Figure 1.** (A1) Photographs of coacervate droplets formed in ternary mixtures of DeA, THF and  $\text{H}_2\text{O}$ , and (A2) the SUPRAS generated by their flocculation. (B) Light microscopy micrograph of the DeA-based SUPRAS. (C) Scheme of the hexagonal arrangement of DeA molecules in the coacervate droplets. (D) DeA-THF-  $\text{H}_2\text{O}$  phase diagram. (E) Variation of the concentration of DeA in the SUPRAS as a function of the THF-to- $\text{H}_2\text{O}$  ratio used in its synthesis

The SUPRAS is produced in a wide range of concentrations of DeA, THF and  $\text{H}_2\text{O}$  (Fig. 1D) and its composition is environment-dependent.<sup>34</sup> Thus, the concentration of DeA in the SUPRAS exponentially decreases as the THF/ $\text{H}_2\text{O}$  ratio increases (Fig. 1E) despite its complete incorporation from the bulk solution, due to an exponential increase of both THF and water in the SUPRAS. As the content of water in the SUPRAS increases, the size of the vacuoles also does and consequently, the size of the inverted hexagonal aggregates increases (Fig. 1E).<sup>31,34</sup> It is worth noting the high concentration of DeA in the SUPRAS ( $0.2\text{--}0.75 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ ) in the whole range of experimental conditions in which it forms (Fig. 1E). This fact and the concurrence of two types of interactions (halogen bond and dispersion) that can work in a cooperative manner, should certainly contribute to speed up the extraction of HBCD enantiomers from soils and sediments.

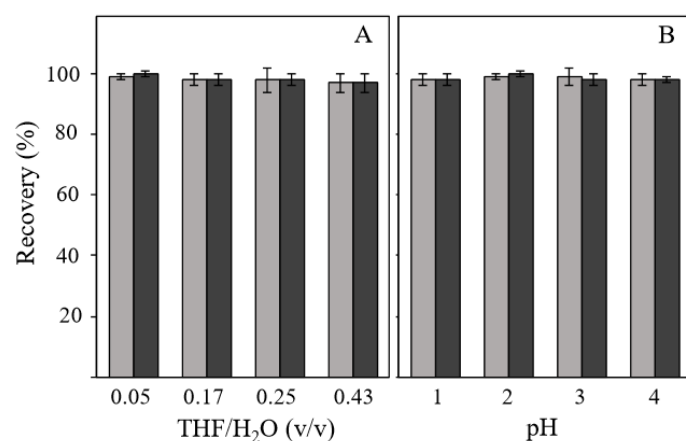
### 3.1.2. Optimisation

Optimal conditions for the extraction of HBCD enantiomers with SUPRAS were investigated by extracting blank sediment and soil samples, freshly fortified with 100 ng g<sup>-1</sup> of racemic  $\gamma$ -HBCD, and quantifying the respective extracted enantiomers [(+)- $\gamma$ - and (-)- $\gamma$ -HBCD] by LC-MS/MS. Sediment samples were made up of fine grained sand and silt, and soil samples of sand, silt and clay. Organic matter content of both sediment and soil samples was around 4%. It was assumed that extraction efficiencies for  $\alpha$ - and  $\beta$ -HBCD enantiomers, less hydrophobic than  $\gamma$ -HBCD enantiomers (Table 1), would be similar. Experiments were carried out in triplicate. Mean recoveries, calculated from results obtained for both (+)- $\gamma$ - and (-)- $\gamma$ -HBCD, were used as a criterion for optimization.

The influence of SUPRAS composition on the extraction of  $\gamma$ -HBCD enantiomers was investigated by synthesizing different solvents from a constant amount of DeA (6.5 g) and variable THF to H<sub>2</sub>O ratios (0.05-0.43 v/v, THF+H<sub>2</sub>O = 84 mL). The pH of the aqueous solution was adjusted in the range 1-4 using hydrochloric acid to ensure that the amphiphile was in the neutral form (pK<sub>a</sub> = 4.8±0.2). Soils and sediments (400 mg) were extracted using 400  $\mu$ L of each of the SUPRAS produced. Recoveries obtained for  $\gamma$ -HBCD in both type of samples with the different SUPRAS investigated are shown in Fig. 2. Quantitative recoveries were achieved in all cases after 5 min of vortex shaking. The fast extraction kinetics and high extraction efficiencies obtained at the low solvent volume/sample amount ratio tested (1  $\mu$ L mg<sup>-1</sup>) was considered an indicator of the strength of the interactions established between HBCD and the different SUPRAS. Because solvent composition had not influence on recoveries, we recommend the use of SUPRAS obtained from the minimal THF/water ratio in order to minimize organic solvent consumption. Thus, the SUPRAS synthesized from a THF/water ratio of 0.05 (pH of water =2) was selected as optimal.

The minimum SUPRAS volume/sample amount ratio required to quantitatively extract  $\gamma$ -HBCD in soil/sediments was investigated using SUPRAS volumes and sample amounts within the intervals 250-1,600  $\mu$ L and 250-800 mg, respectively. SUPRAS volume/sample amount ratios below 0.6 were unsuitable for reliable quantification of  $\gamma$ -HBCD enantiomers owing to the low volume of extract obtained after sample extraction and centrifugation (i.e. <50  $\mu$ L). Quantitative extractions were obtained for the rest of SUPRAS volume/sample amount ratios investigated (Table 3). A sample amount of 400 mg and a SUPRAS volume of 250  $\mu$ L were selected (ratio= 0.625) as optimal. Under these conditions, the volume of THF consumed per sample was as low as 0.12 mL.





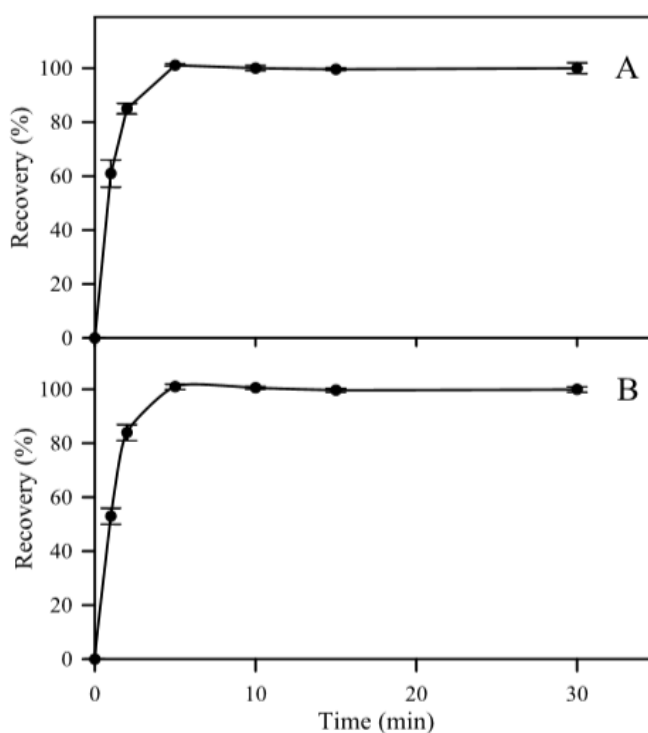
**Figure 2.** (A1) Mean recoveries obtained for  $\gamma$ -HBCD in sediment (light gray bars) and soil (dark gray bars) using SUPRAS produced at variable (A) THF to H<sub>2</sub>O ratios and (B) pH values. Error bars represent standard deviations (n=6). Experimental conditions for SUPRAS synthesis: DeA amount = 6.5 g, THF+H<sub>2</sub>O = 84 mL, (A) pH = 2, (B) THF/H<sub>2</sub>O = 0.05 v/v. Experimental conditions for extractions: amount of sample = 400 mg, volume of SUPRAS = 400  $\mu$ L, extraction time in vortex shaker (vibration rate = 2,500 rpm) = 5 min.

**Table 3.** Mean recoveries obtained for  $\gamma$ -HBCD as a function of the volume of SUPRAS and the amount of sediment/soil sample used for analysis.

Variable	SUPRAS volumen/sample amount ratio (μL mg <sup>-1</sup> )	Recovery ± s <sup>a</sup> (%)	
		Sediment	Soil
SUPRAS volume (μL) (400 mg of sample)			
250	0.6	99 ±1	100 ±1
400	1.0	94 ± 3	93 ± 2
800	2.0	98 ± 1	99 ± 2
1,600	4.0	90 ± 5	95 ± 3
Sample amount (mg) (500 μL of SUPRAS)			
250	2.0	97 ± 6	97 ±4
500	1.0	99 ± 3	98 ± 4
650	0.8	101 ± 2	99 ± 1
800	0.6	99 ± 1	99 ± 2

<sup>a</sup> Standard deviation (n=6)

Extractions were performed using vortex shaking at a vibration rate of 2,500 rpm (the maximum provided by the vortex-shaker REAX Top). Fig. 3 shows the variation of recoveries obtained for  $\gamma$ -HBCD in sediment and soil samples with extraction time. No significant differences between recoveries obtained for both types of samples were observed. Quantitative recoveries were reached in 5 min and they kept constant up to at least 30 min.



**Figure 3.** Mean recoveries obtained for  $\gamma$ -HBCD in (A) sediment and (B) soil samples as a function of the time of extraction using vortex-shaking. Error bars represents standard deviations (n=6). Vibration rate = 2,500 rpm, sample amount = 400 mg, volume of SUPRAS = 250  $\mu$ L.

Centrifugation of the sample at 15,000 rpm for 10 min after extraction is recommended. Lower rotation rates or centrifugation times did not provide an effective separation of sample particles from the SUPRAS extract.

It was checked that, under the experimental conditions selected, the extraction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -HBCD enantiomers in soils and sediments with SUPRAS, similarly to  $\gamma$ -HBCD enantiomers, was quantitative (recoveries in the range 97-100%).

### 3.1.3. Extractability of HBCD enantiomers in aged soils and sediments

It is well known that the extractability of organic pollutants in soils and sediments decreases with longer pollutant-matrix contact times.<sup>35</sup> Sorption of organic pollutants to natural particles mainly occurs by their diffusion through the pores within particles (pore diffusion) and penetrable solid phases (matrix diffusion) and may require weeks to months to reach equilibrium.<sup>21,36,37</sup> Enhanced retention of pollutants into aged soils and sediments is usually due to their chance to find high-energy and multiple adsorption sites and/or become physically trapped.<sup>21</sup> Sorption behavior of pollutants is also affected by matrix water content. Competition with water significantly reduces the sorption of hydrophobic pollutants in mineral micropores.<sup>38</sup>

The effect of sample ageing on the extractability of HBCD enantiomers in soils and sediments was investigated by analyzing blank samples fortified with 50 ng g<sup>-1</sup> of each enantiomer at different times after spiking. Both aged dry and wetted samples were prepared according to the procedure specified in section 2.3.1. Samples were subjected to sterilization before spiking and kept under refrigeration at 4° C after fortification in order to inhibit microbial growth and thus prevent HBCD biological degradation. Aliquots of dry and wet sediment/soil samples were analyzed at 2, 90 and 180 days after spiking. Table 4 shows the results obtained. Recoveries above 90% were found for all the enantiomers in both dry and wet samples at the aging times investigated. The independency of recoveries from aging time suggests that SUPRAS may establish high-energy interactions with HBCD.

**Table 4.** Recoveries obtained for HBCD enantiomers using the DeA-based SUPRAS as a function of the time of contact between analytes and sediment/soil particles in absence (dry sample) and presence of water [20% (v/w), wet sample].

Sample <sup>a</sup>	HBCD-sediment/soil contact time (days)	Recovery $\pm$ s <sup>b</sup> (%)					
		(+)- $\alpha$	(-)- $\alpha$	(+)- $\beta$	(-)- $\beta$	(+)- $\gamma$	(-)- $\gamma$
Dry sediment	2	98 $\pm$ 2	97 $\pm$ 3	99 $\pm$ 3	100 $\pm$ 2	98 $\pm$ 2	97 $\pm$ 2
	90	95 $\pm$ 2	92 $\pm$ 5	95 $\pm$ 5	95 $\pm$ 3	102 $\pm$ 5	100 $\pm$ 2
	180	94 $\pm$ 5	96 $\pm$ 4	97 $\pm$ 3	96 $\pm$ 4	97 $\pm$ 2	96 $\pm$ 3
Wet sediment	2	98 $\pm$ 2	97 $\pm$ 4	102 $\pm$ 3	99 $\pm$ 2	99 $\pm$ 3	98 $\pm$ 4
	90	97 $\pm$ 2	98 $\pm$ 2	99 $\pm$ 1	99 $\pm$ 2	99 $\pm$ 1	96 $\pm$ 2
	180	96 $\pm$ 2	95 $\pm$ 3	98 $\pm$ 6	96 $\pm$ 4	98 $\pm$ 2	99 $\pm$ 2
Dry soil	2	98 $\pm$ 3	98 $\pm$ 2	98 $\pm$ 2	99 $\pm$ 3	99 $\pm$ 2	98 $\pm$ 2
	90	97 $\pm$ 3	99 $\pm$ 4	93 $\pm$ 4	99 $\pm$ 4	94 $\pm$ 2	92 $\pm$ 5
	180	96 $\pm$ 5	97 $\pm$ 2	94 $\pm$ 4	96 $\pm$ 6	98 $\pm$ 4	96 $\pm$ 6
Wet Soil	2	97 $\pm$ 5	95 $\pm$ 4	98 $\pm$ 5	97 $\pm$ 4	101 $\pm$ 3	99 $\pm$ 4
	90	99 $\pm$ 2	97 $\pm$ 1	98 $\pm$ 2	98 $\pm$ 3	97 $\pm$ 1	96 $\pm$ 3
	180	93 $\pm$ 5	94 $\pm$ 4	96 $\pm$ 6	94 $\pm$ 5	99 $\pm$ 2	97 $\pm$ 4

<sup>a</sup> Spiked HBCD enantiomer concentration: 50 ng g<sup>-1</sup>; <sup>b</sup> Standard deviation (n=3)

### 3.2. Analytical performance

The SUPRAS was fully compatible with the determination of HBCDs by chiral LC-MS/MS, not influencing either retention times or peak areas measured for the analytes. The DeA aggregates which form the SUPRAS disassemble in the mobile phase producing surfactant monomers that are separated from the analytes in the chromatographic column and directly addressed to waste after separation, avoiding, in this way, ion-source contamination and/or loss of ionisation efficiency and detector sensitivity. Since the SUPRAS did not affect signals obtained for the analytes, calibration curves for determination of HBCD enantiomers in soils and sediments were run from standard solutions in methanol ( $n=6$ ) using the isotope-labelled internal standard approach (section 2.3.4). Isotopically labelled standards are routinely used in the quantitation of HBCD in soils and sediments to compensate for matrix effects, despite the exhaustive sample cleanup always carried out.<sup>24,26,27,30,39</sup> In the method here proposed, no sample cleanup was applied and SUPRAS extracts were directly analysed by LC-MS/MS.

To evaluate matrix effects (ME) two sets of calibration were prepared. The first set (A) consisted of five standards in methanol at concentrations of each HBCD enantiomer in the range 0.3-1,200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The second set (B) was prepared by spiking the HBCD enantiomers (same concentration range as used for set 1) in SUPRAS aliquots obtained after sediment/soil extraction according to the procedure in section 2.3.3. Matrix effects were evaluated by comparing the slopes of the calibration curves obtained for each analyte by sets 1 and 2 according to  $\text{ME (\%)} = B/A \times 100$ . The ME calculated in this manner may be referred to as an absolute matrix effect; percentages higher than 100 indicate ion enhancement, while percentages lower than 100 are indicative of ion suppression. The ME values obtained for HBCD enantiomers varied within the range 18-34.

The suitability of  $^{13}\text{C}_{12}$  HBCD isomers to compensate for matrix effects was investigated by comparing, for each enantiomer, the slope of the calibration curve obtained from standards ( $n=5$ ) in methanol (0.3-1,200  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) with that obtained from SUPRAS extracts, fortified with HBCDs after sediment/soil extraction. Both methanol and SUPRAS extracts were also spiked with a constant concentration of IS (100  $\mu\text{g L}^{-1}$  of each HBCD enantiomer). Calibration curves were obtained by plotting peak area ratios ( $A/A_{\text{IS}}$ ;  $A$  = peak area of individual enantiomers and  $A_{\text{IS}}$  = peak area of the corresponding IS) versus the concentration of enantiomers injected. The slopes of the calibration curves obtained for soils and sediments and the experimental  $t$ -values obtained by applying a Student's  $t$  test<sup>40</sup> are shown in Table 5. Calibration curves obtained for standards in methanol were almost identical to those shown in Table 2. No statistically significant difference between the slopes of the calibration curves

obtained from standards in methanol and in sediment/soil extracts was found. The experimental t-values were below the critical t value (3.7, significant level = 0.01). So, the isotopically labelled standards used were able to compensate for the observed matrix effects in both sediment and soil samples.

**Table 5.** Slopes of the calibration curves obtained for HBCD enantiomers from SUPRAS extracts fortified with analytes after sediment/soil extraction and experimental t-values obtained by comparing the slopes with that obtained for standards in methanol

HBCD enantiomer	Slope $\pm s^a \times 10^3$ ( $\mu\text{g}^{-1} \text{L}$ )		Experimental t-value	
	Sediment extract	Soil extract	Sediment extract	Soil extract
(+)- $\alpha$ -HBCD	2.29 $\pm$ 0.03	2.87 $\pm$ 0.04	0.53	2.73
(-)- $\alpha$ -HBCD	2.21 $\pm$ 0.03	2.63 $\pm$ 0.02	1.50	3.35
(+)- $\beta$ -HBCD	6.62 $\pm$ 0.07	6.43 $\pm$ 0.09	2.30	0.65
(-)- $\beta$ -HBCD	6.36 $\pm$ 0.06	6.18 $\pm$ 0.07	0.11	2.48
(+)- $\gamma$ -HBCD	2.71 $\pm$ 0.03	2.79 $\pm$ 0.04	2.04	2.13
(-)- $\gamma$ -HBCD	2.91 $\pm$ 0.05	2.82 $\pm$ 0.07	3.22	3.53

<sup>a</sup>Standard deviation (n=5)

Table 2 shows the linear ranges for HBCD enantiomers and the sensitivity parameters obtained using the isotope-labelled internal standard method. The linear range for calibration curves was confirmed by visual inspection of the plot residuals versus analyte concentration. The number of positive residuals was approximately equal to that of negative ones and both of them were randomly scattered around the average residual value. Instrumental quantification limits of 0.2 and 0.3  $\mu\text{g L}^{-1}$  were obtained for  $\alpha$ -/ $\beta$ -HBCD and  $\gamma$ -HBCD enantiomers, respectively.

Method quantitation (MQLs) and detection (MDLs) limits were calculated from calibration curves using peak areas 10 and 3 times higher than noise, respectively. The noise at the retention time of each analyte was measured from six independent complete analyses of 400 mg-sediment and soil samples containing no HBCD at detectable concentration levels and considering a signal to noise ratio of 10 and 3 respectively. Higher MDL and MQL values were

obtained for all the enantiomers in soils compared to sediments (Table 2) because of the bigger noise observed for the former.

The precision was evaluated in terms of repeatability and reproducibility by analysing eighteen aliquots of a blank sediment and a blank soil sample spiked with 100 ng g<sup>-1</sup> of racemic  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD during three days (six aliquots each). The within-assay precision, expressed as standard deviation, was calculated as the square root of the average value of the intra-day variances obtained and, the between-assay one as the square root of the mean intra-day variance plus the inter-day variance. The relative standard deviations obtained under repeatability conditions for sediment and soil samples were 2.8 and 1.0 % for (+)- $\alpha$ , 2.7 and 4.0 % for (-)- $\alpha$ , 2.8 and 2.7 % for (+)- $\beta$ , 2.3 and 2.0 % for (-)- $\beta$ , 3.0 and 2.72 for (+)- $\gamma$ , and 2.1 and 3.0 for (-)- $\gamma$  and those obtained under reproducibility conditions 3.5 and 2.5% for (+)- $\alpha$ , 3.4 and 5.0% for (-)- $\alpha$ , 3.9 and 4.2% for (+)- $\beta$ , 2.9 and 2.5% for (-)- $\beta$ , 4.2 and 3.8% for (+)- $\gamma$ , and 3.4 and 4.3 for (-)- $\gamma$ .

Finally, because of the low amount of sediment/soil subsamples taken for analysis (400 mg), it was investigated if they were representative of the whole sample. For this purpose, the variances obtained for the measurement of the HBCD enantiomers in 400 mg sediment/soil subsamples fortified with 50 ng g<sup>-1</sup> of each analyte were compared with those obtained from the measurement of 400 mg aliquots taken from a 50 g sediment/soil sample spiked at the same concentration level. No statistically significant differences between both variances were observed by applying a Fisher test [41]. The experimental F-values were in the interval 1.07-3.48 and were below the critical F-value (5.05, significant level=0.05).

### 3.3. Analysis of sediment and soil samples

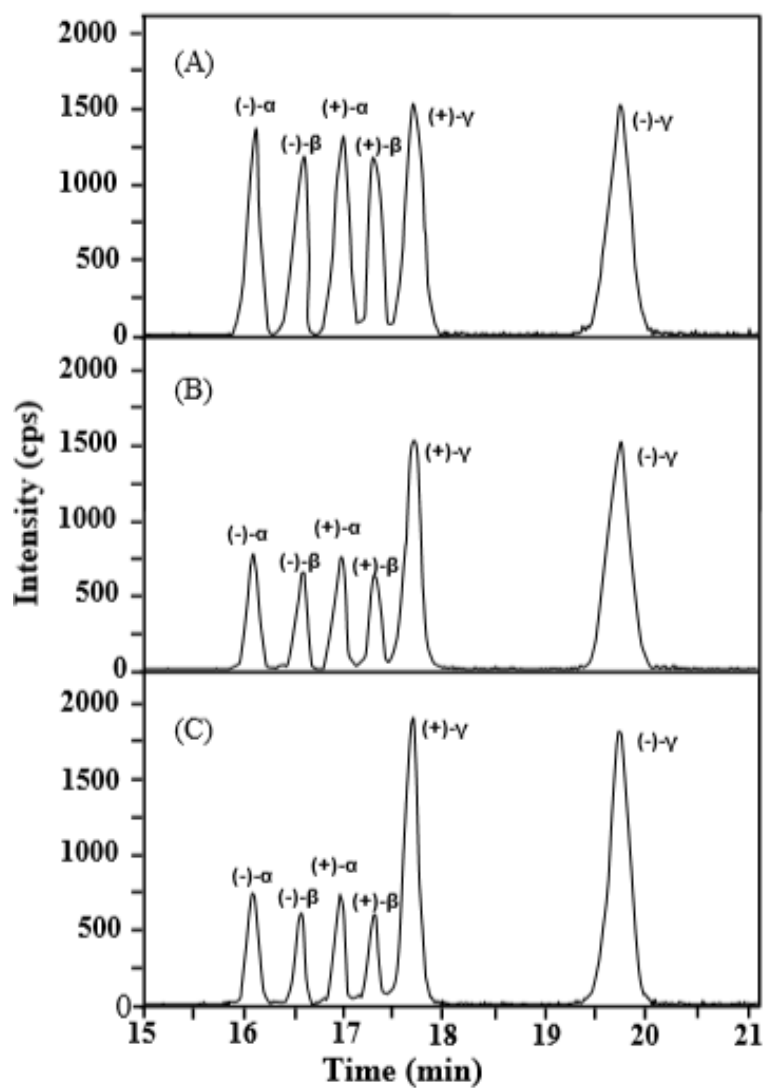
The method here developed was applied to the quantification of HBCD enantiomers in both non-fortified and fortified (5 and 100 ng g<sup>-1</sup> of each enantiomer) sediment and soil samples. No HBCD enantiomers were detected in the non-spiked samples. The recoveries and enantiomeric ratios obtained from the analysis of the spiked samples are listed in Table 6. The recoveries ranged from 93 to 102 % with relative standard deviations from 1 to 8 %. As expected, enantiomeric ratios near 1 were obtained in the samples analyzed for all the racemic HBCD diastereoisomers. Figure 4 compares the chromatograms obtained from a standard solution (A) with those obtained from the analysis of fortified sediment (B) and soil (C) samples. Clean chromatograms were obtained for all the samples analyzed.

**Table 6.** Recovery of HBCD enantiomers and enantiomeric ratio for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD, obtained from the analysis of spiked sediments and soils.

Sample	Added enantiomer concentration (ng g <sup>-1</sup> )	Recovery ± s <sup>a</sup> (%)				Enantiomeric ratio ± s <sup>a</sup>				
		(+)-α	(-)-α	(+)-β	(-)-β	(+)-γ	(-)-γ	α	β	γ
<i>Sediments</i>										
Rumblar	5	101±3	97±4	97±3	98±4	96±8	94±2	1.04±0.05	0.99±0.05	1.02±0.09
	100	97±3	94±5	94±4	93±6	93±3	93±3	1.03±0.06	1.01±0.08	1.00±0.05
Guadajoz	5	97±5	99±4	100±5	98±3	99±4	97±3	0.98±0.06	1.02±0.06	1.02±0.05
	100	100±2	103±7	99±5	99±2	99±2	98±4	0.97±0.07	0.96±0.05	1.01±0.05
Guadalquivir	5	97±2	97±4	99±5	97±2	97±2	96±2	1.00±0.05	1.02±0.06	1.01±0.03
	100	98±2	97±5	98±4	100±1	99±2	99±2	1.01±0.06	0.98±0.04	1.00±0.03
Jándula	5	100±1	99±5	95±2	98±1	99±7	101±5	1.01±0.05	0.97±0.02	0.98±0.08
	100	99±1	100±7	98±3	100±1	100±3	98±2	0.99±0.07	0.98±0.03	1.02±0.04
Rabanales	5	100±1	98±6	100±3	96±6	98±3	93±6	1.02±0.06	1.04±0.07	1.05±0.08
	100	100±1	100±2	97±3	99±2	99±3	99±2	1.00±0.02	0.98±0.04	1.00±0.04
<i>Soils</i>										
Soil A <sup>b</sup>	5	100±4	97±4	96±3	98±3	100±6	98±2	1.03±0.06	0.98±0.04	1.02±0.06
	100	99±2	102±3	100±3	95±2	98±3	97±4	0.97±0.04	1.05±0.04	1.01±0.05
Soil B <sup>c</sup>	5	96±5	97±1	98±1	99±2	100±4	96±5	0.99±0.05	0.99±0.02	1.04±0.07
	100	98±1	101±6	97±2	97±2	99±3	98±3	0.97±0.06	1.00±0.03	1.01±0.04

<sup>a</sup> Standard deviation (n=3); <sup>b</sup> Soil composition: organic matter = 1.2%, clay = 66%, silt = 16% and sand = 18%; <sup>c</sup> Soil composition: organic matter = 3.8%, clay = 12%, silt = 15% and sand = 73%.





**Figure 4.** Mean LC-MS/MS selected ion chromatograms obtained from (A) a standard solution containing 50 ng mL<sup>-1</sup> of each HBCD enantiomer and (B,C) 400 mg of sample (B: Guadajoz sediment, C: soil A) spiked with 200 ng g<sup>-1</sup> of racemic α-, β- and γ-HBCD.

### 3.4. Comparative study of methods

Table 7 compares the SUPRAS-based approach developed in this work with methods reported in the literature for the determination of HBCDs in sediment and soils. In previously reported methods, mixtures of both polar and toxic nonpolar organic solvents are used in order to achieve acceptable recoveries for the target analytes. The total volume of organic solvent required per sample (35-270 mL versus 0.12 mL), the solvent volume/sample amount ratio needed (7-70 mL g<sup>-1</sup> versus 0.3 mL g<sup>-1</sup>), and the time spent for sample treatment (higher than 25-2,880 min versus 15 min) considerably decreases as the SUPRAS is used. The complexity of the procedure is also highly reduced with the use of the SUPRAS. Thus, usual steps in reported methods (i.e. energy-assisted extraction, removal of sulfur, SPE and evaporation of the extract) are reduced to a conventional extraction without the need for auxiliary energies. Finally, the SUPRAS-based extraction approach provides improved recoveries compared with those obtained using organic solvent-based extraction methods, and their quantification limits in both soils and sediments are low enough for determining the concentrations usually found in contaminated areas.<sup>26,42</sup>

**Table 7.** LC-MS/MS methods for the determination of HBCD isomers or enantiomers in sediments and soils.

HBCDs determined	Sample type (size)	Sample treatment		Extract concentration	Time spent (min)	Solvent consumed (mL)	Recovery (%)	Quantitation	Ref.
		Extraction	Clean-up						
Isomers $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	Marine sediment (5 g)	Microwave-assisted extraction (40 mL acetone:n-hexane 1:3, v/v, 90 °C, 800 w)	Extract concentration in rotary vacuum evaporator, two successive liquid-liquid extractions using tetrabutylammonium sulfate-propanol-water and n-hexane-dichloromethane 1:1, v/v, 60 °C, 100 atm	Evaporation to dryness and reconstitution in methanol (100 $\mu$ L)	> 31	69	68-91	LC-MS	30
		Homemade pressurized liquid extraction (20 mL n-hexane: dichloromethane 1:1, v/v, 60 °C, 100 atm)			> 54	49	73-85	Isotopically labelled ISI	
		Soxhlet extraction (100 mL, acetone-n-hexane 1:3, v/v)	extraction on an anhydrous sodium sulfate/acidified silica column		> 1459	129	72-80		
Isomers $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ and enantiomers (+) $\alpha$ , (-) $\alpha$ , (+) $\beta$ , (-) $\beta$ , (+) $\gamma$ , (-) $\gamma$	Soil (10-30 g)	Soxhlet extraction (200 mL acetone:n-hexane 1:1, v/v)	Sulfur removal by addition of activated copper granules, concentration of the extract in rotary vacuum evaporator and solid phase extraction on a multilayer silica/alumina column	Evaporation to near dryness and reconstitution in methanol (200 $\mu$ L)	> 2.880	270		LC-MS/MS	24
		Soxhlet extraction (acetone:n-hexane 1:1, v/v)	Sulfur removal by addition of activated copper granules, concentration of the extract in rotary vacuum evaporator, solid phase extraction on a sulphuric acid silica/neutral silica column	Evaporation to near dryness and reconstitution in methanol (200 $\mu$ L)	> 1.440	> 110		LC-MS/MS	27, 39
Enantiomers (+) $\alpha$ , (-) $\alpha$ , (+) $\beta$ , (-) $\beta$ , (+) $\gamma$ , (-) $\gamma$	Riverine sediment (0.5 g)	Pressurized liquid extraction (35 mL, n-hexane:dichloromethane 1:1, v/v, 100 °C, 100 atm, alumina at the bottom of the extraction cell)		Evaporation to incipient dryness and reconstitution in methanol (200 $\mu$ L)	> 25	35		LC-MS/MS	26
								Isotopically labelled ISI	
Enantiomers (+) $\alpha$ , (-) $\alpha$ , (+) $\beta$ , (-) $\beta$ , (+) $\gamma$ , (-) $\gamma$	Riverine sediment and soil (0.4 g)	SUPRAS microextraction (250 $\mu$ L) for 5 min and centrifugation for 10 min			15	0.12	93-102	LC-MS/MS	This paper
								Isotopically labelled ISI	

Time spent for sample treatment methods involving an evaporation step is expressed as greater than (>) because the difficulty to estimate the time required for this step.

#### 4. CONCLUSIONS

The research here presented proves that a supramolecular solvent able to establish halogen bonds speeds up and simplifies the extraction of HBCD enantiomers in soils and sediments. These high-energy bonds, combined with the possibility of establishing additional interactions (e.g. dispersion) and multiple sites for binding (i.e. the concentration of amphiphile in the SUPRAS is at the level of  $\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$ ), provides great analytical and operational benefits for HBCD isolation from solid natural matrices. Thus, the procedure here developed is robust and provides high extraction yields for HBCDs using conventional equipment and a green solvent that can be easily synthesized through an energyless spontaneous process.

The approach here developed can be easily extended to the extraction of other brominated flame retardants (e.g. polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A) in different types of matrices (water, biological, dust, etc.). In this way, their quantification can be speed up, thus facilitating the assessment of human exposure to these contaminants as well as the study of their occurrence, fate and distribution in the environment.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MINECO (Project CTQ2014-53539-R) and FEDER.

**REFERENCES**

- <sup>1</sup> P. Metrangolo, G. Resnati, *Chem. Eur. J.* 7 (2001) 2511-2519.
- <sup>2</sup> L.P. Wolters, P. Schyman, M. J. Pavan, W.L. Jorgensen, F. M. Bickelhaupt, S. Kozuch, *Mol. Sci.* 4 (2014) 523-540.
- <sup>3</sup> P. Metrangolo, F. Meyer, T. Pilati, G. Resnati, G. Terraneo, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 6114-6127.
- <sup>4</sup> L. C. Gilday, S.W. Robinson, T.A. Barendt, M.J. Langton, B. R. Mullaney, P.D. Beer, *Chem. Rev.* 115 (2015) 7118-7195.
- <sup>5</sup> G. Cavallo, P. Metrangolo, R. Milani, T. Pilati, A. Priimagi, G. Renati, G. Terraneo, *Chem. Rev.* 116 (2016) 2478-2601.
- <sup>6</sup> M. Erdelyi, P. Metrangolo, *Acta Cryst.* B73 (2017) 135.
- <sup>7</sup> C.C. Robertson, J.S. Wright, E.J. Carrington, R.N. Perutz, C.A. Hunter, L. Brammer, *Chem. Sci.* 8 (2017) 5392-5398.
- <sup>8</sup> K. Eskandari, M. Lesani, *Chem. Eur.* 21 (2015) 4739-4746
- <sup>9</sup> X.Q. Yan, Q.J. Shen, X.R. Zhao, H.Y. Gao, X. Pang, W.J. Jin, *Anal. Chim. Acta* 753 (2012) 48-56.
- <sup>10</sup> Ch. Li, L. Li, X. Yang, W.J. Jin, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 520 (2017) 497-504.
- <sup>11</sup> P. Peluso, V. Mamane, E. Aubert, S. Cossu, *J. Chromatogr. A* 1345 (2014) 182-192.
- <sup>12</sup> P. Peluso, V. Mamane, E. Aubert, A. Dessì, R. Dallochio, A. Dore, P. Pale, S. Cossu, *J. Chromatogr. A* 1467 (2016) 228-238.
- <sup>13</sup> List of Substances of very high concern of the European Chemical Agency. ECHA SVHC List 2018. [http://www.chemsafetypro.com/Topics/EU/REACH\\_SVHC\\_List\\_Substance\\_of\\_Very\\_High\\_Concern.html](http://www.chemsafetypro.com/Topics/EU/REACH_SVHC_List_Substance_of_Very_High_Concern.html)
- <sup>14</sup> Chemicals of Concern identified by the U.S. EPA. <http://saferchemicals.org/get-the-facts/the-chemicals-of-concern-identified-by-the-u-s-epa>. Last visit: February 2018.

- <sup>15</sup> Persistent Organic Pollutants Review Committee, 2011. Risk management evaluation on hexabromocyclododecane. UNEP/POPS/POPRC.7/19/Add.1.
- <sup>16</sup> C.H. Marvin, G.T. Tomy, J.M. Armitage, J.A. Arnot, L. McCarty, A. Covaci, V. Palace, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 8613-8623.
- <sup>17</sup> Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. United Nations. Decision SC-6/13.
- <sup>18</sup> S.-L. Badea, V.C. Niculescu, R.-E. Ionete, E. Eljarrat, *Sci. Total Environ.* 566-567 (2016) 1120-1130.
- <sup>19</sup> S. Hayward, Y.D. Lei, F. Wania, *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (2006) 2018-2017.
- <sup>20</sup> Y. Wen, L.M. Su, W.C. Qun, L. Fu, J. He, Y. H. Zhao, *Chemosphere* 86 (2012) 634-640.
- <sup>21</sup> J.J. Pignatello, B. Xing, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 1-11.
- <sup>22</sup> Y. Zhang, Q. Li, Y. Lu, K. Jones, A. J. Sweetman, *Chemosphere* 148 (2016) 504-510.
- <sup>23</sup> C.S. Wong, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 544-558.
- <sup>24</sup> S. Gao, J. Wang, Z. Yu, Q. Guo, G. Sheng, J. Fu, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 2093-2099.
- <sup>25</sup> J. Wu, Y. Guan, Y. Zhang, X. Luo, H. Zhi, S. Chen, B. Mai, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 5490-5495.
- <sup>26</sup> P. Guerra, E. Eljarrat, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 1203 (2008) 81-87.
- <sup>27</sup> A.-H. Feng, S.-J. Chen, M.-Y. Chen, M.-J. He, X.-J. Luo, B.-X. Mai, *Mar. Pollut. Bull.* 64 (2012) 919-925.
- <sup>28</sup> X.-Z. Meng, Y.-P. Duan, C. Yang, Z.-Y. Pan, Z.-H. Wen, L. Chen, *Chemosphere* 82 (2011) 725-731.
- <sup>29</sup> D. Drage, J.F. Mueller, G. Birch, G. Eaglesham, L.K. Hearn, S. Harrad, *Sci. Total Environ.* 512-513 (2015) 177-184.
- <sup>30</sup> H.-H. Wu, H.-C. Chen, W.-H. Ding, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7755-7760.
- <sup>31</sup> A. Ballesteros-Gómez, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta* 677 (2010) 108-130.

- <sup>32</sup> F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473-7484.
- <sup>33</sup> K. Janák, A. Covaci, S. Voorspoels, G. Becher, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 1987-1994.
- <sup>34</sup> A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 84 (2012) 342-349.
- <sup>35</sup> A. Li, X. Liu, *J. Environ. Eng.* 131 (2005) 1068-1072.
- <sup>36</sup> B. Geva, K.T. Semple, K.C. Jones, *Environ. Pollut.* 108 (2000) 3-14.
- <sup>37</sup> D. Brion, E. Pelletier, *Chemosphere* 61 (2005) 867-876.
- <sup>38</sup> H. Cheng, E. Hu, Y. Hu, *J. Contam. Hydrol.* 129-130 (2012) 80-90
- <sup>39</sup> M.-J. He, X.-J. Luo, J.-P. Wu, S.-J. Chen, *Environ. Pollut.* 179 (2013) 105-110.
- <sup>40</sup> L. Cuadros, A.M. García, F. Alés, C. Jiménez, M. Román, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 471-476.
- <sup>41</sup> B.G.M. Massart, L.M.C. Vandeginste, S. de Jong Buydens, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Data Handling in Science and Technology Series*, Vol. 20A. Elsevier, Amsterdam (1997) p. 179.
- <sup>42</sup> R. J. Law, C. R. Allchin, J. de Boer, A. Covaci, D. Herzke, P. Lepom, S. Morris, J. Tronczynski, C. A. de Wit, *Chemosphere* 64 (2006) 187-208.



Journal of Chromatography A

Volume 1600, 30 August 2019, Pages 95-104



## HALOGEN BONDING FOR INCREASING EFFICIENCY IN LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION: APPLICATION TO THE EXTRACTION OF HEXABROMOCYCLODODECANE ENANTIOMERS IN RIVER WATER

A. B. Lara, C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio

*Department of Analytical Chemistry, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, University of Córdoba, Edificio Anexo Marie Curie, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain*

### ABSTRACT

Halogen bonding (XB) was here proposed, for the first time, as a solubilization mechanism for increasing efficiency in the liquid-liquid microextraction of halogenated compounds. The approach was illustrated by the extraction of hexabromocyclododecane (HBCD) enantiomers in natural waters with a supramolecular solvent (SUPRAS) made up of inverted hexagonal aggregates of decanoic acid. The XB and dispersion interactions offered by the SUPRAS were able to extract the six HBCD enantiomers [i.e. (+)- $\alpha$ -, (-)- $\alpha$ -, (+)- $\beta$ -, (-)- $\beta$ -, (+)- $\gamma$ - and (-)- $\gamma$ -] quantitatively (e.g. recoveries in the range 89-106%) and reach concentration factors as high as 720 without the need for solvent evaporation. HBCD enantiomers in the SUPRAS extract were directly analysed by chiral liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Quantitation limits of the method (0.09-0.9 ng L<sup>-1</sup>) were below the quality standard established by the European Union for HBCDs in inland surface water samples (1.6 ng L<sup>-1</sup>), and the precision, expressed as relative standard deviation (n=6), was below 9% for all the HBCD enantiomers at concentrations within the range 50-500 ng L<sup>-1</sup>. The method was successfully applied to the enantioselective determination of HBCDs in the dissolved and the particle-bound fractions of river waters containing different concentration of suspended particles (10-57.8 mg L<sup>-1</sup>) that were spiked at two concentration levels (10 and 100 ng L<sup>-1</sup>). The results here obtained prove that XB is a valuable mechanism for the solubilisation of



halogenated compounds that can effectively increase their recovery from liquid and solid samples.

*Keywords:* Halogen bonding, supramolecular solvents, hexabromocyclododecane enantiomers, chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry, river water

## 1. INTRODUCTION

Liquid-liquid microextraction is a well-consolidated strategy in analytical chemistry to reduce organic solvent consumption and simplify sample treatment.<sup>1</sup> Multiple operational, environmental and economic advantages have been associated to the miniaturization of extraction techniques,<sup>2</sup> however the microextraction of analytes present in samples at very low concentration (e.g. ng L<sup>-1</sup>) is often hampered due to the unfavourable extraction efficiencies obtained at the solvent/sample ratios used. Maximizing analyte-solvent interaction is a general strategy in chemistry to increase extraction efficiency at low solvent/sample ratios.<sup>3</sup> So, solvents offering high-energy noncovalent bonds, multiple interaction mechanisms and a huge number of binding sites should be the primary choice for analyte microextraction.

Halogen bonding (XB) has recently emerged as a new retention mechanism in SPE<sup>4,5</sup> and enantioseparations<sup>6,7</sup> and it has been recently proposed by our research group as an innovative strategy for speeding up the extraction of HBCD enantiomers in soils, sediments<sup>8</sup> and fish.<sup>9</sup> Halogen bonding involves the attractive interaction of covalently-bound halogen atoms with an electron-rich region of a neighbouring atom or molecule (e.g. electron density donors such as N, O, P, S, etc.).<sup>10</sup> Both the high energy of XB (up to 200 kJ mol<sup>-1</sup>)<sup>10</sup> and its effective competition with hydrogen bonding in solution<sup>11</sup> makes XB highly promising for liquid-liquid microextraction of halogenated compounds in aqueous solutions, a strategy not explored so far.

The presence of halogenated hydrophobic compounds in natural waters is one issue of global concern since this source is considered of primary importance for human and wildlife exposure to these pollutants.<sup>12</sup> Among halogenated compounds, hexabromocyclododecane (HBCD) isomers have deserved special attention due to their persistence,<sup>13</sup> toxicity,<sup>14,15</sup> bioaccumulation in living organisms<sup>12</sup> and biomagnification in the food chain.<sup>16</sup> HBCDs are brominated flame retardants used in insulation materials that can be released into the environment via air and water transport during production, use and after disposal.<sup>17</sup> They are industrially produced as a mixture of enantiomers in the proportion: 10-13% (+)/(-)- $\alpha$ -HBCD, 0.5-12% (+)/(-)- $\beta$ -HBCD and 75-89% (+)/(-)- $\gamma$ -HBCD.<sup>18</sup>

**Table 1.** Analytical methods for the determination of HBCDs in environmental waters

HBCDs determined	Sample treatment		Time spent (min)	Solvent consumed (mL)	Recovery (%)	Quantitation	Reference
	Sample type (size)	Extraction	Clean-up				
Isomers $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	Whole river and waste waters (15 L)	Liquid-liquid extraction (20 mL n-hexane)	SPE on a multi-layer silica gel column	> 35	140	LC-MS/MS Isotopically labelled IS	17
	Whole river and waste waters (0.5-5.0 L)	Simultaneous SPE on C18-disk and filtration on glass fiber filter and Soxhlet extraction of the disk and the filter (150 mL n-hexane)	SPE on a graphite carbon column	> 188	200	LC-MS/MS Isotopically labelled IS	20
	Whole lake waters and their dissolved and particulate phases (40 L)	Filtration via gravity on a glass fiber filter, filtration on two polyurethane foam plugs and Soxhlet extraction with dichloromethane of the filter (particulate phase), the plugs (dissolved phase) or both (whole water)	SPE on an acidified silica column	> 480	> 25	LC-MS/MS Isotopically labelled IS	21
	Dissolved phase of lake waters (5 L)	Filtration on a glass fiber filter and SPE on a polymeric sorbent column		> 60	13	LC-MS/MS Isotopically labelled IS	22
Isomers $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ and enantiomers (+)- $\alpha$ , (-)- $\alpha$ , (+)- $\beta$ , (-)- $\beta$ , (+)- $\gamma$ , (-)- $\gamma$	Dissolved phase of lake, river and snow waters (100 mL)	Filtration on a micropore membrane filter and SPE on a bamboo charcoal column		> 35	12.5	LC-MS/MS	23
	Dissolved phase of industrial effluents (500 mL)	Filtration on a glass microfibre filter and a nylon membrane filter and automated SPE on a C18 column		133	27	LC-MS/MS Isotopically labelled IS	24
	Particulate phase of industrial effluents (500 mL)	Pressurized liquid extraction of the particulate matter retained on both a glass and a nylon filter	SPE on an alumina column	> 50		LC-MS/MS Isotopically labelled IS	24
	Dissolved phase of river water (40 L)	Filtration on a glass fiber filter and SPE on a polymeric adsorbent using in batch ultrasonic-assisted desorption (3x50 mL methanol and 3x25 mL dichloromethane)	Back-extraction in dichloromethane (3x50 mL), evaporation to dryness, reconstitution in hexane and SPE on a multi-layer silica/alumina column	> 1,440	450	LC-MS/MS Isotopically labelled IS	25
	Particulate phase of river water (40 L)	Soxhlet extraction (acetone/hexane 1:1, v/v) of the particulate matter retained on a glass filter	Extract concentration by solvent evaporation and SPE on a silica column	> 30		LC-MS/MS Isotopically labelled IS	25

<sup>a</sup>Time spent for sample treatment involving an evaporation step is expressed as greater than (>) because the difficulty to estimate the time required for this step

<sup>b</sup>Apparent recoveries; isotopically labelled IS added to water samples before extraction.

<sup>c</sup>Extractions performed from aqueous solutions or water samples spiked after filtration

Evaluation of the environmental risk of the presence of HBCDs in natural waters involves their quantification in both the dissolved and the particulate fraction; the first one determines their bioavailability to aquatic organisms while the second one has relevance in their fate and transport behavior.<sup>19</sup> Table 1 shows the most significant methods developed so far for the determination of HBCDs in natural waters. Most of them focus on the determination of isomers<sup>17,20-24</sup> and only one has been devoted to the determination of enantiomers,<sup>25</sup> even though the correct evaluation of the environmental risks to this pollutant requires knowing its enantiomeric distribution.<sup>26</sup>

Determination of HBCDs in natural waters has been invariably carried out by LC-MS/MS after a thorough sample treatment involving high water volumes (e.g. 0.5-40 L) and different steps.<sup>20-25</sup> Thus, sample treatment generally includes: (a) separation of the dissolved and particle fractions by filtration; (b) solid phase extraction (SPE) of HBCD from the dissolved fraction, (c) HBCD desorption from the filter and/or SPE sorbent, (d) solvent- or SPE-based cleanup, (e) solvent evaporation and (f) sample reconstitution. Because of the high HBCD hydrophobicity ( $\log K_{ow} = 5.6$ ),<sup>27</sup> enantiomers are strongly retained in the water particulate fraction and materials used for their extraction (e.g. filters and SPE columns). The strong retention of HBCDs on solid materials makes highly challenging their efficient recovery through the whole sample treatment process.

To the best of our knowledge, the reliability of filtration for separation of the dissolved and particle-bound HBCD fractions remains to be proved. We hypothesize that HBCD enantiomers will have a high tendency to be retained in filter materials, which should cause underestimation of the HBCD content in the dissolved phase. So, the suitability of filtration for estimation of HBCD distribution in natural waters should be investigated.

Extraction of the targeted analytes from filters or SPE disks is carried out by organic solvents (e.g. hexane, dichloromethane, acetone-hexane, methanol, etc.) using extraction with Soxhlet,<sup>20,21,25</sup> or assisted by different auxiliary energies (e.g. ultrasounds<sup>25</sup> or pressure).<sup>24</sup> The obtained extracts are further cleaned-up by SPE on silica,<sup>17,21,25</sup> alumina,<sup>24</sup> silica-alumina<sup>25</sup> or graphite.<sup>20</sup> Sample treatment also includes at least one concentration step by solvent evaporation. These multiple and laborious steps are time-consuming (the whole process usually takes between 1 and 8 h), require a high volume of organic solvent (12.5-450 mL per sample) and give low HBCD recoveries, which stands in contrast with the huge number of samples required for a sound evaluation of the occurrence and distribution of HBCD in natural waters.

This paper was intended to exploit the benefits of using halogen bonding for the development of a simple, fast, green and efficient analytical method for the determination of HBCD enantiomers in the dissolved and particle-bound fractions of natural waters. For this purpose, a supramolecular solvent (SUPRAS) made up of decanoic acid (DeA), tetrahydrofuran (THF) and water was investigated.<sup>28</sup> This SUPRAS offers two types of interactions for HBCD; halogen bond through the oxygen atom of the C=O group of the carboxylic acid and dispersion interactions in the hydrocarbon chains. Additional benefits of using this SUPRAS as extractant are the huge concentration of amphiphile it contains ( $\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$ ), which ensures multiple binding sites for HBCDs, and the possibility of acting as a restricted access material for humic acids, which derives of the ability of tailoring the size of the aqueous cavity of the hexagonal inverted aggregates making up the SUPRAS. DeA-based SUPRAS has been already proved to effectively extract halogenated compounds from solid samples,<sup>8,9</sup> however, to the best of our knowledge, halogen bonding has not been yet explored as a mechanism of extraction of halogenated compounds in aquatic environments. In these systems, high partition coefficients are required to extract quantitatively the target analytes at trace concentrations using very low solvent/sample ratios, while keeping high sample throughput (e.g. integration of analyte extraction and sample cleanup in a single step and no need for evaporation of extracts).

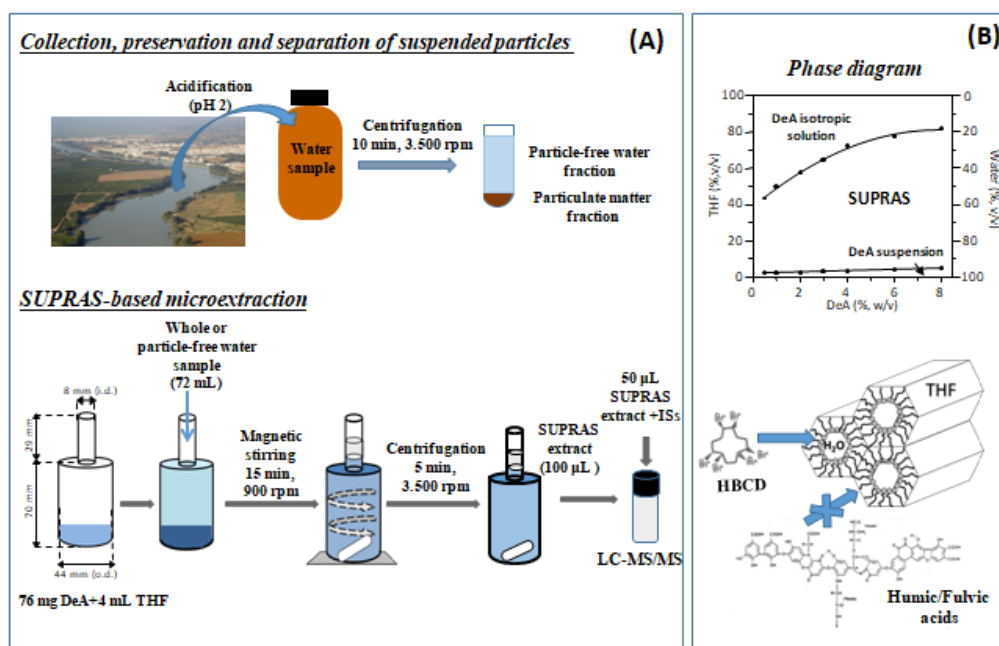
Because of the lack of studies about the reliability of using filtration for the separation of the dissolved and particle-bound HBCD fractions, investigations on HBCD retention on different filter materials were also undertaken. Below, the most relevant results obtained in this study are presented and discussed.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Standards and reagents

All chemicals were of analytical reagent-grade and used as supplied. Decanoic acid (DeA) was purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) and Wellington Labs (Guelph, Canada) provided unlabelled and  $^{13}\text{C}_{12}$  labelled HBCD isomers ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) as racemic solutions in toluene of  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (97% purity) and  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (98% purity), respectively. Working solutions of these isomers ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) were prepared in methanol and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . They were stable during at least 3 months. Panreac (Barcelona, Spain) supplied LC-grade tetrahydrofuran (THF) and hydrochloric acid, and Merck (Darmstadt, Germany), LC-grade water, acetonitrile and methanol.

## 2.2. Apparatus



**Figure 1.** (A) Scheme for the sample treatment procedure used to determine HBCD enantiomers in both whole and particle-free water samples by LC-MS/MS. (B) DeA-THF-H<sub>2</sub>O phase diagram and scheme of the nanostructure of the SUPRAS.

The LC-MS system used was a hybrid triple quadrupole/linear ion trap (Applied Biosystems MSD Sciex 4000QTRAP, Foster City, CA, USA) coupled to a liquid chromatograph Agilent HP 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with a TurbolonSpray (TIS) interface. All data were acquired and processed using the Analyst 1.5.1 Software. HBCD enantiomers were separated on a chiral column Nucleodex  $\beta$ -PM (200 mm  $\times$  4.0 mm, 5  $\mu$ m) from Macherey-Nagel (Düren, Germany).

A multi-position magnetic stirrer RO 10 power IKAMAG® from IKA®-Werke GmbH & Co. KG. (Staufen, Germany) and a digitally regulated centrifuge Mixtasel equipped with an angle rotor 4  $\times$  100 mL (cat. 7001326) from JP-Selecta (Abrera, Spain) were used for sample treatment. To make easier the collection of the supramolecular solvent used as extractant, the extraction of river water samples was performed using centrifuge tubes designed by authors and constructed by Pobel S.A. (Madrid, Spain, webpage: [www.pobel.com](http://www.pobel.com)). Figure 1A shows a

schematic picture and dimensions of these tubes. A digital calliper from Medid Precision, S.A. (Barcelona) was used to measure the volume of solvent.

### 2.3. Collection, spiking and preservation of river water samples

Water samples were taken in April 2017 from three rivers (Guadalquivir, Rumblar and Jándula) flowing through the South of Spain. They were collected in brown glass bottles pre-cleaned with acetone and methanol, acidified to pH 2 by adding hydrochloric acid and stored at 4 °C until analysis. The concentration of particulate matter in river samples was determined by filtration of 1 L of water through glass fiber filters (AP40, Merck, Madrid, Spain) and air-drying and weighing them. Measurements were made in triplicate. Fortified samples were prepared by adding a minute volume of a standard solution containing 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (15-200  $\mu\text{L}$ ) or 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  (5-240  $\mu\text{L}$ ) of unlabelled HBCD isomers to 72 mL of river water. Spiked samples were homogenized by magnetic stirring for 5 min and afterwards, they were allowed to stand at room temperature for 30 min before analysis.

### 2.4. Studies on the separation of dissolved and particle-bound HBCD enantiomers

Both filtration and centrifugation were evaluated to separate particle-bound from dissolved HBCD in natural water. Filtration via gravity was carried out using glass wool (Panreac, Barcelona, Spain) placed into a glass funnel. Vacuum filtration was performed using a filtration system equipped with a glass holder for 47 mm disc filters (Pobel S.A., Madrid, Spain). The following filters (0.45  $\mu\text{m}$ -pore size), supplied by Merck (Madrid, Spain), were tested: glass fiber AP40, hydrophilic nylon HNWP04700, hydrophilic fluoropore FHLP04700 and biologically inert mixtures of cellulose acetate and cellulose nitrate HAWP04700. For sample centrifugation, 100-mL centrifuge tubes obtained from Pobel S.A. (Madrid, Spain) and a digitally regulated centrifuge Mixtasel (for details see Section 2.2) were used. The effectiveness of centrifugation for separating the particulate fraction was assessed by nephelometric turbidity measurements in a turbidimeter HI 88713 from Hanna Instrument (Guipúzcoa, Spain).

### 2.5. Extraction efficiency studies

The influence of variables on the efficiency of extraction of HBCD in river water was studied by analysing spiked samples (200  $\text{ng L}^{-1}$  of racemic  $\alpha$ -HBCD,  $\beta$ -HBCD and  $\gamma$ -HBCD). For this purpose, sample were taken from Jándula river (concentration of suspended particles =

57.8±0.2 mg L<sup>-1</sup>). Both whole- and particle-free water were extracted using the procedure specified in Section 2.7.1 by varying each variable in turn while the others remained constant. The variables investigated were the concentration of DeA and THF, pH, ionic strength, temperature and extraction time. ISs (100 µg L<sup>-1</sup> of each enantiomer) were added just prior injection of the extracts in the liquid chromatograph-mass spectrometer in order to correct for matrix effect and MS performance and ensure accurate quantification during extraction efficiency studies. Conditions for the separation and quantification of the HBCD enantiomers are specified in Section 2.7.2. Selection of the optimum extraction conditions was based on the concentration factors (FCs) obtained for α-, β- and γ-HBCD isomers. The effect of the time of contact between the analytes and the particulate matter in river water on extraction yields was also assessed. All the experiments were made in triplicate.

## 2.6. Recoveries and matrix effect studies

Method recovery (R), absence or presence of matrix effects (ME) and overall process efficiency (PE) were evaluated for both whole and particle-free river water samples. The evaluation was performed by preparing five calibration sets;<sup>29</sup> the set A consisted of seven standards in methanol at concentrations of each enantiomer in the range 1-1,200 µg L<sup>-1</sup>. The sets B1 and B2 were prepared by spiking the HBCDs at the same concentration range used in set (A) in SUPRAS extracts obtained by applying the extraction procedure described in Section 2.7.1 to a river water sample before and after removing suspended particles. In sets C1 and C2 the whole and particle-free water samples were spiked before subjecting them to the extraction procedure. ME, R and PE were evaluated by comparing the slopes of the calibration curves obtained according to:

$$\text{ME (\%)} = \text{B/A} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{R (\%)} = \text{C/B} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{PE (\%)} = (\text{ME} \times \text{R})/100 = \text{C/A} \times 100 \quad (3)$$

The ME calculated in this manner may be referred to as an absolute matrix effect; percentages higher than 100 indicate ion enhancement, while percentages lower than 100 are an indication that ion suppression occurs.

## 2.7. Procedure for the determination of HBCD enantiomers in river water

### 2.7.1. SUPRAS-based microextraction

DeA (76 mg) was dissolved in THF (4 mL) into a centrifugation tube. Then, 72 mL of a whole-river water or particle-free river water was added. The particle-free river water was obtained by centrifuging the whole river water at 3,500 rpm (2,400xg) for 10 min. After sealing the tube with parafilm to avoid THF evaporation, the mixture was magnetically stirred for 15 min at 900 rpm to favour analytes extraction and then, centrifuged at 3,500 rpm (2,400xg) for 10 min to accelerate phase separation. The supramolecular extract obtained after centrifugation (about 100  $\mu$ L) was standing at the top of the solution in the narrow neck of the tube. An aliquot of 50  $\mu$ L of the extract was withdrawn using a microsyringe and transfer to an autosampler glass vial with insert. Finally, 2  $\mu$ L of the IS solution (see Section 2.1) were added to the extract before subjecting it to LC-MS/MS. Fig. 1A shows a scheme of the whole procedure.

### 2.7.2. Stereoselective determination of HBCD in supramolecular extracts

HBCD enantiomers were separated, identified and quantified using chiral LC coupled to tandem mass spectrometry. The mobile phase consisted of acetonitrile/methanol (70:30, v/v) (A) and water/methanol (70:30, v/v) (B). The elution program was a linear gradient from 50:50 A:B to 90:10 A:B over the first 8 min, 90:10 A:B through the next 10 min and then 100:0 A:B for 3 min. Reconditioning the column took about 10 min. The flow-rate of the mobile phase was 0.3 mL min<sup>-1</sup>, the temperature of the column 40 °C and the injection volume 10  $\mu$ L. The eluates from the analytical column were diverted by the switching valve to waste from 0 to 15 min to avoid entering the mass spectrometer matrix components or decanoic acid. The elution order of each enantiomer was assigned according to Janák et al.<sup>30</sup>



**Table 2.** Analytical figures of merit of the proposed method

HBCD enantiomers	Instrumental calibration parameters				Whole-river water		Particle-free river water	
	Linear range <sup>a</sup> (μg L <sup>-1</sup> )	Slope ± s x10 <sup>3</sup> (μg <sup>-1</sup> L)	Intercept ± s x10 <sup>3</sup>	r <sup>b</sup>	S <sub>xy</sub> x10 <sup>3</sup> c	MDL <sup>d</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	MQLE <sup>e</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	MDL <sup>d</sup> (ng L <sup>-1</sup> )
(+)-α	0.2-1,200	2.29±0.03	-0.02±0.03	0.9995	0.06	0.13	0.44	0.10
(-)-α	0.2-1,200	2.25±0.02	-0.01±0.02	0.9998	0.03	0.22	0.82	0.26
(+)-β	0.2-1,200	6.62±0.09	0.06±0.07	0.9995	0.16	0.04	0.12	0.04
(-)-β	0.2-1,200	6.6±0.1	0.07±0.09	0.9993	0.19	0.12	0.42	0.12
(+)-γ	0.3-1,200	2.76±0.04	-0.01±0.03	0.9994	0.07	0.04	0.12	0.04
(-)-γ	0.3-1,200	2.85±0.02	0.00±0.02	0.99990	0.03	0.04	0.15	0.02

<sup>a</sup>Instrumental quantitation limit calculated by using a signal-to-noise ratio of 10<sup>b</sup>Correlation coefficient<sup>c</sup>Standard error of the estimate<sup>d</sup>Detection and <sup>e</sup>quantitation limits of the method

Identification and quantitation of analytes were performed operating in the selected reaction monitoring (SRM) mode using the  $[M-H]^- \rightarrow Br^-$  transitions at  $m/z$  640.9 $\rightarrow$ 78.9 (quantifier ion) and 640.9 $\rightarrow$ 80.9 (qualifier ion). The IS was monitored at the  $m/z$  652.6 $\rightarrow$ 80.9 transition. The instrumental parameters in the TIS source and analyzer were optimized to obtain the highest relative intensity. The TIS source values were as follows: curtain and nebulizer gas, 50 psi; turbo gas, 10 psi; temperature of the turbo gas, 350 °C; ion spray voltage, -4,500 V; entrance potential, 10 V; and declustering potential, -85 V for analytes and -35 V for ISs. The analyzer settings were as follows: 1.0 unit resolution for the first and third quadrupoles; collision gas,  $3.0 \times 10^{-5}$  Torr; collision energy, -48, -32 and -72 V; and collision cell exit potential, -17, -7 and -1 V for the transitions 640.9 $\rightarrow$ 78.9, 640.9 $\rightarrow$ 80.9 and 652.6 $\rightarrow$ 78.9, respectively. Calibration curves were constructed from standard solutions in methanol containing the target HBCD enantiomers over the ranges stated in Table 2 and constant concentrations of ISs (100  $\mu\text{g L}^{-1}$  of each enantiomer). The concentration of the HBCDs in the extracts obtained from both whole-water (C1) and particle-free water (C2) were calculated from calibration curves obtained by plotting area ratios ( $A/A_{IS}$ ;  $A$  = peak area of individual enantiomers and  $A_{IS}$  = peak area of the corresponding IS) versus the concentration of analyte injected. The concentrations of the HBCDs in the whole river water (C), dissolved (CDP) and particulate (CPP) phases were calculated from C1 and C2 taking into account the concentration factor achieved by the SUPRAS-based extraction method ( $CF=720$ ) and the concentration of suspended particles in the sample (CSP):  $C = C1 \times CF$ ;  $CDP = C2 \times CF$ ;  $CPP = (C1 - C2)/CSP$ .

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. SUPRAS characteristics and interactions with HBCD enantiomers

In order to achieve high extraction efficiencies and concentration factors in the liquid-liquid and liquid-solid extraction of HBCD from the dissolved and particle-bound fractions of river water, the following requirements were imposed to the solvent: ability for establishing both halogen bond and dispersion interactions with HBCDs and presence of multiple binding sites. With this aim, a supramolecular solvent synthesized in situ in the river water sample under addition of decanoic acid (DeA) and THF was selected.

Figure 1B shows the percentages of DeA, THF and water at which the SUPRAS is generated.<sup>28</sup> The protonated form of DeA dissolves in THF forming reversed micelles and coacervates under the addition of water giving hexagonal inverted aggregates.<sup>31</sup> The DeA in the SUPRAS is able to establish with HBCD enantiomers both halogen bonds through the oxygen of the C=O groups of carboxylic acids and dispersion interactions through the hydrocarbon chains.

On the other hand, the hexagonal inverted aggregates are environmental responsive and this means that the volume of solvent generated, the concentration of DeA in the SUPRAS, and the size of the vacuoles can be tailored by modifying the proportion of THF and water in which the DeA self-assembles.

The volume of SUPRAS generated in ternary mixtures of DeA-THF-water fits the following equation:<sup>32</sup>

$$V_{\text{SUPRAS}} = (1.04 \pm 0.02) \text{ DeA} \cdot e^{(0.0473 \pm 0.0009) \text{ THF}} \quad (4)$$

where  $V_{\text{SUPRAS}}$ , DeA and THF are expressed in  $\mu\text{L}$ , mg and % (v/v), respectively. So, concentration factors expected for HBCD in the river water can be easily predicted. Because of the incorporation of DeA to the SUPRAS in the coacervation process is practically constant, its concentration decreases as the  $V_{\text{SUPRAS}}$  increases (e.g. the concentration of surfactant goes from 0.75 to 0.38 mg  $\mu\text{L}^{-1}$  when the percentage (v/v) of THF increases from 5 to 20%). These figures indicate that, independently of the environmental conditions (i.e. percentage of THF in the synthetic solution), the number of binding sites offered by the SUPRAS is huge, as it can be inferred from the high concentration of amphiphile it always contains. Finally, the possibility of tailoring the size of the vacuoles of the hexagonal inverted aggregates has been extensively applied to the exclusion of macromolecules such as carbohydrates and humic and fulvic acids from extraction, which facilitates sample cleanup.<sup>8, 32-35</sup> These restricted access properties of the SUPRAS selected will be used here for helping to remove matrix interferences.

### 3.2. Method optimization

Estimation of the distribution of HBCD enantiomers in the dissolved and particle-bound fractions was here undertaken by formation in situ of the SUPRAS in both whole and particle-free water samples. Because of the strong adsorption of HBCD to solid surfaces and the lack of studies on their retention on filters, a thorough study on the suitability of filtration for the separation of dissolved and particle-bound HBCD was initially carried out using different filter materials previously used for this purpose [see Table 1 and references.<sup>20-25</sup> With this aim, 80 mL-aliquots of deionized water containing 200 ng  $\text{L}^{-1}$  of racemic  $\alpha$ -,  $\beta$  and  $\gamma$ -HBCD were filtered according to the procedure described in Section 2.4 and HBCD enantiomers remaining in the filtrate determined following the procedure described in Section 2.7. In order to rule out losses of analytes by adsorption on the wall of glass containers, the unfiltered solution was also analysed. Recoveries (%) obtained for (+)- $\alpha$ -, (-)- $\alpha$ -, (+)- $\beta$ -, (-)- $\beta$ -, (+)- $\gamma$ - and

(-)- $\gamma$ -HBCD in the unfiltered solution were  $95 \pm 6$ ,  $96 \pm 5$ ,  $99 \pm 2$ ,  $101 \pm 3$ ,  $98 \pm 6$  and  $96 \pm 4$ . Table 3 shows the concentration of HBCD enantiomers found in the filtrates. As it can be inferred from these results, filtration is not a suitable method for determining the distribution of HBCD in the dissolved and particle bound fraction of natural waters since it causes an important underestimation of the concentration of HBCD in the dissolved fraction.

**Table 3.** Percentage (mean value  $\pm$  standard deviation,  $n=3$ ) of HBCD enantiomers remaining in the filtrate after filtration of deionized water containing 200 ng L<sup>-1</sup> of racemic  $\alpha$ -,  $\beta$  and  $\gamma$ -HBCD.

Filter	(+)- $\alpha$	(-)- $\alpha$	(+)- $\beta$	(-)- $\beta$	(+)- $\gamma$	(-)- $\gamma$
Glass wool	$37 \pm 6$	$34 \pm 7$	$26 \pm 3$	$21 \pm 2$	$15 \pm 1$	$17 \pm 1$
Glass fiber	$21 \pm 2$	$21 \pm 2$	$15 \pm 2$	$12 \pm 3$	$10 \pm 2$	$11 \pm 2$
Nylon	$27 \pm 8$	$25 \pm 7$	$28 \pm 8$	$22 \pm 7$	$23 \pm 7$	$25 \pm 9$
Cellulose	$17 \pm 5$	$15 \pm 3$	$17 \pm 2$	$11 \pm 2$	$13 \pm 2$	$13 \pm 1$
Polytetrafluoroethylene	$9 \pm 3$	$10 \pm 2$	$11 \pm 2$	$10 \pm 2$	$9 \pm 2$	$9 \pm 1$

In order to overcome this problem, centrifugation was explored for the physical separation of both fractions. For this purpose, water samples taken from the Jándula river (concentration of suspended particles =  $57.8 \pm 0.2$  mg L<sup>-1</sup>) were centrifuged at 3,500 rpm (2,400 $\times$ g) for varying times (5-30 min), and the nephelometric turbidity of the liquid fraction was measured and compared to that given by deionized water. Nephelometry is the standard technique to measure turbidity because of its sensitivity, precision and applicability over a wide particle size, including very fine particles.<sup>36,37</sup> Experiments were made in triplicate. Turbidity decreased from  $49.7 \pm 0.3$  NTU to  $0.9 \pm 0.1$ ,  $0.7 \pm 0.1$  and  $0.60 \pm 0.05$  NTU for centrifugation times of 5, 10 and 20 min, respectively. Turbidities measured for centrifugated samples were quite close to that measured for deionized water ( $0.27 \pm 0.02$  NTU), which indicates that most particles were removed from the river water sample.

To compare the efficiency of centrifugation and filtration for particle removing, the maximum diameter of particles ( $d$ , cm) in supernatants after centrifugation were determined using the following equation:<sup>38</sup>

$$d = \sqrt{\frac{18 \eta \ln \frac{R}{S}}{t \Delta \rho \omega^2}}$$

where  $\eta$  is the viscosity of the suspension medium (viscosity of water at 20 °C = 0.010 g cm<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>),  $R$  is the distance (cm) from the axis of rotation to the surface of the solid decanted,  $S$  is the distance (cm) from the axis of rotation to the surface of the suspension in the tube,  $t$  is the centrifugation time (s),  $\Delta \rho$  is the difference in density between the particles and the suspension medium (g mL<sup>-1</sup>) and  $\omega$  is the angular velocity of the centrifuge (rad s<sup>-1</sup>). The density of the particle depends on its mineral composition, but most of them are composed of quartz with a density of nearly 2.6-2.7 g mL<sup>-1</sup> or of calcareous material with a density of c.a. 2.9 g mL<sup>-1</sup>. In practical calculations a value of 2.65 g mL<sup>-1</sup> is usually employed,<sup>39</sup> hence, a  $\Delta \rho$  value of 1.65 g mL<sup>-1</sup> was used in this study. The values of  $R$  and  $S$  were 12.0 a 7.0 cm, respectively, and the angular velocity, calculated from the equation:  $\omega = \frac{2\pi}{60} \text{ rpm}$ , was 366.5 rad s<sup>-1</sup>.

The maximum diameter of particles in supernatants obtained using centrifugation times of 5, 10 and 20 min were 0.38, 0.27 and 0.19  $\mu\text{m}$ , respectively. So, under the reported experimental conditions, centrifugation was more efficient than filtration for the removal of suspended particles from river water samples (pore size of filters = 0.45  $\mu\text{m}$ ). Thus, centrifugation was considered a more reliable method for the physical separation of the dissolved and particle-bound fractions for HBCDs. A centrifugation time of 10 min was used in further studies.

The SUPRAS-based extraction of HBCDs from the whole and liquid fraction was optimized according the procedure specified in Section 2.5. Recoveries for the targeted analytes were quantitative and independent of the percentages of DeA and THF used for SUPRAS formation. Table 4 shows, as an example, the results obtained by analyzing whole water samples. Since the volume of SUPRAS increases linearly and exponentially with the amount of DeA and percentage of THF, respectively (see Eq. 1), 0.1% (w/v) of DeA and 5% (v/v) of THF were chosen as optimal for extraction of HBCDs. Under these conditions, a concentration factor as high as 720 was reached without the need for solvent evaporation. The pH (1-4) or concentration of salt ([NaCl] = 0-1 M) of the solution or the extraction temperature (25-55 °C) did not affect recoveries or CFs for HBCDs. Regarding extraction and centrifugation times, quantitative extraction was achieved in 15 min using magnetic stirring at 900 rpm (recoveries decreased to ca. 75% and 60% when the extraction time was reduced to 10 and 5 min, respectively) and the SUPRAS extract was effectively separated from the bulk solution in 10 min at a centrifugation rate of 3,500 rpm.

**Table 4.** Volume of supramolecular solvent formed ( $V_{\text{SUPRAS}}$ ) and mean percent recoveries (R) and concentration factors (CF) obtained for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD as a function of the percentage of tetrahydrofuran (THF) and decanoic acid (DeA)

Variable	$V_{\text{SUPRAS}}$	$R \pm s^a$ (%)			$CF \pm s^a$		
		$\alpha$ -HBCD	$\beta$ -HBCD	$\gamma$ -HBCD	$\alpha$ -HBCD	$\beta$ -HBCD	$\gamma$ -HBCD
THF <sup>b</sup> (% v/v)							
5	100	101±6	100±3	101±6	720±40	720±20	720±40
10	127	94±3	96±6	96±4	530±20	540±30	540±20
15	161	93±4	99±2	93±2	420±20	444±9	417±9
20	204	100±2	100±2	100±4	354±7	354±7	350±10
DeA <sup>c</sup> (% w/v)							
0.2	200	101±3	102±5	101±4	360±10	370±20	360±10
0.3	300	96±4	99±8	102±3	230±10	240±20	244±7
0.5	501	97±6	92±2	95±4	140±9	132±3	137±6

<sup>a</sup> $n = 6$   
<sup>b</sup>DeA = 0.1 % (w/v)  
<sup>c</sup>THF = 5 % (v/v)

Finally, to check whether the time of contact between HBCD enantiomers and the particulate matter present in river water influenced their extraction, aliquots of a spiked whole-water sample were analysed 30 min, 4 h and 7 days after HBCD spiking. No effect of the time of contact on the recoveries obtained was observed. HBCD recoveries (%) after 30 min, 4 h and 7 days were, respectively:  $99\pm7$ ,  $95\pm7$  and  $102\pm3$  for (+)- $\alpha$ -HBCD,  $95\pm6$ ,  $96\pm6$  and  $98\pm6$  for (-)- $\alpha$ -HBCD,  $96\pm4$ ,  $99\pm2$  and  $102\pm7$  for (+)- $\beta$ -HBCD,  $98\pm3$ ,  $101\pm3$ ,  $99\pm6$  for (-)- $\beta$ -HBCD,  $97\pm5$ ,  $98\pm6$  and  $95\pm6$  for (+)- $\gamma$ -HBCD, and  $99\pm3$ ,  $96\pm4$  and  $98\pm6$  for (-)- $\gamma$ -HBCD.

### 3.3. Analytical performance

#### 3.3.1. Recoveries and matrix effect

**Table 5.** Matrix effect (ME), recovery (R) and process efficiency (PE) for HBCD enantiomers in a whole and a particle-free river water sample

Sample	Enantiomer	ME (%)	R (%)	PE (%)
Whole water	(+)- $\alpha$	$73\pm2$	$95\pm3$	$69\pm2$
	(-)- $\alpha$	$43\pm1$	$106\pm6$	$45\pm2$
	(+)- $\beta$	$80\pm1$	$94\pm3$	$75\pm2$
	(-)- $\beta$	$82\pm3$	$101\pm3$	$83\pm4$
	(+)- $\gamma$	$108\pm5$	$101\pm5$	$109\pm5$
	(-)- $\gamma$	$94\pm4$	$98\pm5$	$93\pm4$
Particle-free water	(+)- $\alpha$	$72\pm4$	$106\pm6$	$76\pm3$
	(-)- $\alpha$	$43\pm1$	$95\pm3$	$41\pm1$
	(+)- $\beta$	$76\pm3$	$91\pm6$	$69\pm4$
	(-)- $\beta$	$83\pm3$	$97\pm3$	$81\pm4$
	(+)- $\gamma$	$108\pm6$	$98\pm7$	$106\pm7$
	(-)- $\gamma$	$100\pm4$	$97\pm5$	$97\pm5$

The results obtained in studies performed on recoveries and matrix effect are shown in Table 5. Absolute recoveries were all in the range 91-107% which confirmed that HBCDs enantiomers were quantitatively extracted from both the whole and the liquid fraction over the entire concentration range investigated. Matrix effects were observed for the HBCD enantiomers eluting first while no effects were detected for  $\gamma$ -HBCD enantiomers. Correction of ionization suppression for these enantiomers was investigated using  $^{13}\text{C}$  labelled standards.

For this purpose, both whole and particle-free river water were fortified with HBCD enantiomers ( $1\text{--}1,670\text{ ng L}^{-1}$ ) and subjected to extraction according the procedure specified in Section 2.7.1. Then, the SUPRAS extracts were fortified with ISs ( $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  of each enantiomer). Calibration curves were obtained by plotting peak area ratios ( $A/A_{\text{IS}}$ ;  $A$  = peak area of individual enantiomers and  $A_{\text{IS}}$  = peak area of the corresponding IS) versus the concentration of enantiomers injected ( $0.7\text{--}1,200\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ). The slopes of these calibration curves were compared with those obtained for the enantiomers in methanol constructed in the same concentration range ( $0.7\text{--}1,200\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ) and fortified with HBCD IS ( $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  of each enantiomer).

No statistically significant difference between the slopes of the calibration curves obtained from standards and sample extracts was found by applying a Student's test.<sup>40</sup> The experimental  $t$ -values obtained for whole and particle-free water samples were, respectively, 0.023 and 0.009 for (+)- $\alpha$ -HBCD, 0.080 and 0.025 for (–)- $\alpha$ -HBCD, 0.003 and 0.012 for (+)- $\beta$ -HBCD, 0.058 and 0.035 for (–)- $\beta$ -HBCD, 0.043 and 0.018 for (+)- $\gamma$ -HBCD, and 0.345 and 0.385 for (–)- $\gamma$ -HBCD. These values were all below the critical  $t$  value (3.36, significant level=0.01). So, the isotopically labelled standards used were able to compensate for matrix effects in both whole and particle-free river water samples.

### 3.3.2. Sensitivity and linearity

Table 2 shows the analytical figures of merit for the proposed method. The linear range for calibration curves was confirmed by visual inspection of the plot residuals versus analyte amount;<sup>41</sup> the residuals were randomly scattered within a horizontal band and a random sequence of positive and negative residuals was obtained.

Method detection (MDLs) and quantitation (MQLs) limits were calculated from six independent complete analyses (experimental procedure in Section 2.7) of both blank whole and particle-free river water samples by using signal-to-noise ratios of 3 and 10, respectively. No significant differences in either noise or analytical signals measured for HBCDs in whole and particle-free waters were observed, and consequently, MDLs and MQLs estimated for both type of samples were similar. The high concentration factor achieved by the SUPRAS-based microextraction method (720) makes it possible to reliably quantify HBCD enantiomers in river water samples at concentrations below the quality standard established by the European Union for HBCDs in inland surface water samples ( $1.6\text{ ng L}^{-1}$ ).<sup>42</sup>



### 3.3.3. Precision

The precision of the proposed method was assessed by spiking six aliquots of a blank water sample taken from the Jándula river with HBCD enantiomers at two concentration level (50 and 500 ng L<sup>-1</sup>) and subjecting them to the whole analytical process (see Section 2.7). The relative standard deviations obtained for the target analytes ranged within the intervals 5.6-7.5% and 3.7-5.0% in whole water and 7.4-8.8% and 3.6-6.5% in particle-free water, at 50 and 500 ng L<sup>-1</sup>, respectively.

## 3.4. Analysis of river water

The proposed method was used for quantifying HBCD enantiomers in both non-fortified and fortified (10 and 100 ng L<sup>-1</sup>) river water samples containing suspended particles at concentrations ranging between 10 and 57.8 mg L<sup>-1</sup>. No HBCD enantiomers were detected in native samples. Results obtained for spiked samples are shown in Table 6. The high recoveries obtained for all the whole-river water samples analysed (89-106%) confirmed the suitability of the selected SUPRAS to effectively compete with binding sites for HBCD in the suspended particles. Table 6 also shows the concentrations of HBCD found in the dissolved fraction as well as the concentrations calculated for HBCD enantiomers in the particulate matter fraction. The concentration of HBCD enantiomers in the dissolved fraction was in concordance with their hydrophobicity ((+)/(-)-γ-HBCD > (+)/(-)-α-HBCD ~ (+)/(-)-β-HBCD).<sup>27</sup> Thus, the concentration of (+)/(-)-γ-HBCD in the dissolved fraction represented around 30-40% of their total concentration in river samples, while for the rest of enantiomers, with very similar hydrophobicity, represented around 40-50%. Since their high hydrophobicity most HBCDs present in the dissolved fraction are adsorbed to humic acids, soluble organic matter that it is not separated from river water samples by the physical procedures used for the removal of solid particles (viz. centrifugation in this work and filtration in previously reported works). Chromatograms obtained from a standard solution (A) and a fortified whole-river water sample (B) are compared in Fig. 2.

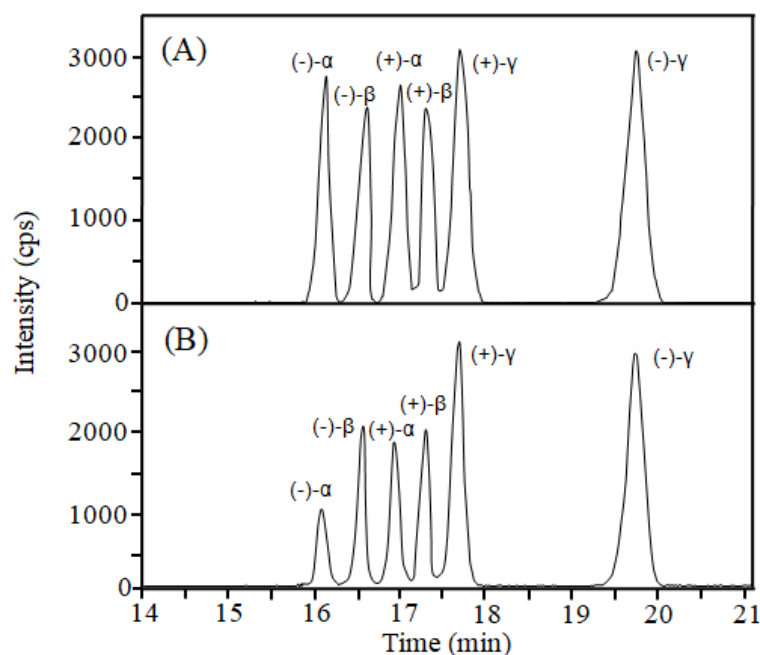
**Table 6.** Concentration found and recovery for HBCD enantiomers in fortified whole river water and dissolved and particulate fractions

Sample site	Analyte	Concentration added (ng L <sup>-1</sup> )	Whole water		Dissolved fraction		Particulate fraction	
			Concentration found <sup>a</sup> ± s <sup>c</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	Recovery <sup>b</sup> ± s <sup>c</sup> (%)	Concentration found <sup>b</sup> ± s <sup>c</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	Percentage of the total	Concentration found <sup>b</sup> ± s <sup>c</sup> (µg g <sup>-1</sup> )	Percentage of the total
Jándula (57.8±0.2 mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	(+)-α	10	9.6±0.5	96±5	3.9±0.9	41	0.098±0.009	59
		100	97±4	97±4	37±4	38	1.03±0.07	62
	(-)-α	10	9.8±0.8	98±8	3.7±0.7	38	0.10±0.01	62
		100	99±3	99±3	38±5	38	1.05±0.09	62
	(+)-β	10	10.0±0.6	100±6	4.2±0.9	42	0.10±0.02	58
		100	97±4	97±4	41±6	42	0.97±0.09	58
	(-)-β	10	9.7±0.7	97±7	4.4±0.6	45	0.091±0.009	55
		100	98±6	98±6	42±3	43	0.97±0.05	57
	(+)-γ	10	9.9±0.8	99±8	2.9±0.8	29	0.12±0.01	71
		100	98±3	98±3	29±2	30	1.19±0.03	70
	(-)-γ	10	10.2±0.3	102±3	3.1±0.7	30	0.12±0.01	70
		100	97±4	97±4	30±4	31	1.16±0.07	69
Guadalquivir (12±1 mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	(+)-α	10	9.4±0.6	94±6	4.5±0.8	48	0.44±0.07	52
		100	97±4	97±4	40±4	41	5.2±0.4	59
	(-)-α	10	9.5±0.5	95±5	4.7±0.7	49	0.44±0.06	51
		100	96±5	96±5	42±4	44	4.9±0.4	56
	(+)-β	10	10.5±0.7	105±7	4.2±0.6	40	0.57±0.06	60
		100	100±6	100±6	45±3	45	5.0±0.3	55
	(-)-β	10	10.0±0.4	100±4	4.0±0.6	40	0.54±0.06	60
		100	97±3	97±3	41±3	42	5.1±0.3	58
	(+)-γ	10	9.6±0.7	96±7	2.9±0.8	30	0.61±0.07	70
		100	98±5	98±5	30±3	31	6.2±0.3	69
	(-)-γ	10	9.9±0.6	99±6	2.8±0.9	28	0.64±0.08	72
		100	96±6	96±6	31±4	32	5.9±0.4	68

Table 6. Continuation.

Sample site	Analyte	Concentration added (mg L <sup>-1</sup> )	Whole water		Dissolved fraction		Particulate fraction	
			Concentration found <sup>b</sup> ± s <sup>c</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	Recovery <sup>b</sup> ± s <sup>c</sup> (%)	Concentration found <sup>b</sup> ± s <sup>c</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	Percentage of the total	Concentration found <sup>b</sup> ± s <sup>c</sup> (µg g <sup>-1</sup> )	Percentage of the total
Rumblar (10±1 mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	(+)-α	10	10.6±0.8	106±8	5.1±0.7	48	0.61±0.08	52
		100	97±4	97±4	49±4	51	5.3±0.4	49
	(-)-α	10	9.4±0.8	94±8	4.8±0.9	51	0.51±0.09	49
		100	95±6	95±6	47±5	49	5.3±0.5	51
	(+)-β	10	9.2±0.6	92±6	4.5±0.5	49	0.52±0.05	51
		100	94±4	94±4	47±4	50	5.2±0.4	50
	(-)-β	10	10.2±0.8	102±8	5.2±0.9	51	0.56±0.09	49
		100	96±3	96±3	50±5	52	5.1±0.5	48
	(+)-γ	10	8.9±0.8	89±8	3.8±0.7	43	0.57±0.08	57
		100	95±2	95±2	39±6	41	6.2±0.6	59
	(-)-γ	10	9.0±0.6	90±6	3.9±0.6	43	0.57±0.06	57
		100	97±4	97±4	40±2	41	6.3±0.2	59

<sup>a</sup>Concentration of suspended particles (mg L<sup>-1</sup>)<sup>b</sup>Mean of three independent determinations.<sup>c</sup>Standard deviation.



**Figure 2.** LC-MS/MS extracted ion chromatograms obtained from (A) a standard solution containing  $70 \mu\text{g L}^{-1}$  of each HBCD enantiomer and (B) a water river sample containing suspended particles at a concentration of  $57.8 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$  and spiked with  $200 \text{ ng L}^{-1}$  of racemic  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD.

#### 4. CONCLUSION

The results obtained have proved that DeA-based SUPRASs were able to effectively extract HBCDs in both whole and particle-free river water samples using a very low solvent/sample ratio ( $1.4 \times 10^{-3}$ ) and provide extracts that can be directly analyzed by chiral LC-MS/MS. Two outstanding properties of these SUPRAS for this application were the mechanisms of interactions they offered for solubilization of halogenated compounds (halogen bonding and dispersion interactions working in a cooperative manner) and their ability to behave as restricted access materials for macromolecules (e.g. humic acids). The SUPRAS-based approach here proposed compared favorably with the methods previously reported for the

extraction of HBCDs in environmental waters (Table 1). Thus, it provided higher recoveries for enantiomers<sup>24</sup> and the sample treatment was much less labor intensive. The reduction in solvent consumption per sample (4 mL versus 12.5-450 mL), the no need for auxiliary energies, the short extraction times required (15 min versus 35-1,440, Table 1), the high concentration factors reached (720), and the low quantitation limits achieved (0.09-0.90 ng L<sup>-1</sup>) make this approach valuable for the assessment of human health and environmental risk from HBCDs.

On the other hand, centrifugation was here proposed as the most suitable strategy to separate suspended particles from river waters. Adsorption of analytes on the filter materials commonly used for sample filtration has been proved in the present paper to cause a serious underestimation of the dissolved fraction of HBCDs in natural waters.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MINECO (Project CTQ2017-83823-R) and FEDER.

## REFERENCES

- <sup>1</sup> J.M. Kokosa, Trends Anal. Chem. 43 (2013) 2-13.
- <sup>2</sup> B. Hashemi, P. Zohrabi, K.-H. Kim, M. Shamsipur, A. Deep, J. Hong, Trends Anal. Chem. 97 (2017) 83-95.
- <sup>3</sup> F.F. Cantwell, M. Losier, Liquid-liquid extraction, in: J. Pawliszyn (Ed.), Comprehensive Analytical Chemistry, Vol. 37, Elsevier, Amsterdam, 2002, pp. 297-340.
- <sup>4</sup> X.Q. Yan, Q.J. Shen, X.R. Zhao, H.Y. Gao, X. Pang, W.J. Jin, Anal. Chim. Acta 753 (2012) 48-56.
- <sup>5</sup> Ch. Li, L. Li, X. Yang, W.J. Jin, Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 520 (2017) 497-504.
- <sup>6</sup> P. Peluso, V. Mamane, E. Aubert, S. Cossu, J. Chromatogr. A 1345 (2014) 182-192.
- <sup>7</sup> P. Peluso, V. Mamane, E. Aubert, A. Dessì, R. Dallochio, A. Dore, P. Pale, S. Cossu, J. Chromatogr. A 1467 (2016) 228-238.
- <sup>8</sup> A.B. Lara, C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio, Anal. Chim. Acta 1027 (2018) 47-56.
- <sup>9</sup> A.B. Lara, C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio, Anal. Chim. Acta 752 (2012) 62-68.
- <sup>10</sup> C.C. Robertson, J.S. Wright, E.J. Carrington, R.N. Perutz, C.A. Hunter, L. Brammer, Chem. Sci. 8 (2017) 5392-5398.
- <sup>11</sup> P. Metrangolo, F. Meyer, T. Pilati, G. Resnati, G. Terraneo, Angew. Chem. Int. Ed. 47 (2008) 6114-6127.
- <sup>12</sup> M.S. El-Shahawi, A. Hamza, A.S. Bashammakh, W.T. Al-Saggaf, Talanta 80 (2010) 1587-1597.
- <sup>13</sup> Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. United Nations. Decision SC-6/13. <http://chm.pops.int/TheConvention/Overview/TextoftheConvention/ta-bid/2232/Default.aspx>.
- <sup>14</sup> ECHA SVHC Official List. <https://echa.europa.eu/addressing-chemicals-of-concern>.

- <sup>15</sup> Chemicals of Concern identified by the U.S. EPA. [www.saferchemicals.org](http://www.saferchemicals.org).
- <sup>16</sup> C.H. Marvin, G.T. Tomy, J.M. Armitage, J.A. Arnot, L. McCarty, A. Covaci, V. Palace, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 8613-8623.
- <sup>17</sup> Y. Zhang, Y. Lu, P. Wang, Q. Li, M. Zhang, A.C. Johnson, *Sci. Total Environ.* 610-611 (2018) 94-100.
- <sup>18</sup> M. Peled, R. Scharia, D. Sondack. Thermal rearrangement of hexabromocyclododecane. In: J.R. Desmurs, B. Féraud, M.J. Goldstein (Eds.), *Advances in organobromine chemistry II*, Elsevier, Amsterdam, 1995, pp. 92-99.
- <sup>19</sup> H. Zhang, S. Bayen, B. C. Kelly, *Sci. Total Environ.* 523 (2015) 219-232.
- <sup>20</sup> M. Ichihara, A. Yamamoto, K. Takakura, N. Kakutani, M. Sudo, *Chemosphere* 110 (2014) 78-84.
- <sup>21</sup> S. Harrad, M. A.-E. Abdallah, N.L. Rose, S.D. Turner, T. A. Davidson, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 9077-9083.
- <sup>22</sup> J. Xu, Y. Zhang, C. Guo, Y. He, L. Li, W. Meng, China, *Environ. Toxicol. Chem.* 32 (2013) 2249-2255.
- <sup>23</sup> R.-S. Zhao, C. Hu, J.-B. Zhou, J.-P. Yuan, S.-S. Wang, X. Wang, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 1189-1195.
- <sup>24</sup> P. Guerra, A. de la Cal, G. Marsh, E. Eljarrat, D. Barceló, *J. Hydrol.* 369 (2009) 360-367.
- <sup>25</sup> M.-J. He, X.-J. Luo, L.-H. Yu, J.-P. Wu, S.-J. Chen, *Environ. Pollut.* 179 (2013) 105-110.
- <sup>26</sup> C.S. Wong, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 544-558.
- <sup>27</sup> Swedish Chemicals Agency European Commission Risk Assessment hexabromocyclododecane; Sundbyberg, Sweden, 2008.
- <sup>28</sup> F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473-7484.
- <sup>29</sup> B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez, *Eng. Anal. Chem.* 75 (2003) 3019-3030.
- <sup>30</sup> K. Janák, A. Covaci, S. Voorspoels, G. Becher, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 1987-1994.

- <sup>31</sup> A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 84 (2012) 342-349.
- <sup>32</sup> A. Ballesteros-Gomez, F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Perez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 603 (2007) 51-61.
- <sup>33</sup> A. Moral, C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta* 709 (2012) 59-65.
- <sup>34</sup> C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Talanta* 134 (2015) 325-332.
- <sup>35</sup> C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Talanta* 119 (2014) 46-52.
- <sup>36</sup> M.J. Sadar. Turbidity Science. Technical Information Series-Booklet No. 11. Available at: <https://www.hach.com/asset-get.download-en.jsa?code=61792>
- <sup>37</sup> T. Kourki. Turbidity in particle size analysis. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. R.A.Meyers (Ed.). Wiley Online Library. (2016). Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470027318.a1517>.
- <sup>38</sup> L.J. Gimbert, P.M. Haygarth, R. Beckett, P. J. Worsfold, *Environm. Sci. Technol.* 39 (2005) 1831-1735.
- <sup>39</sup> A. Armanini. Introduction to Sediment Transport. In: *Principles of River Hydraulics*. Springer, Cham (2018) Chapter 2, p. 34
- <sup>40</sup> L. Cuadros, A.M. García, F. Alés, C. Jiménez, M. Román, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 471-477.
- <sup>41</sup> B.G.M. Massart, , L.M.C. Vandeginste, S. de Jong Buydens, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Hanbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Data Handling in Science and Technology Series*, Vol. 20A. Elsevier, Amsterdam (1997) p. 179.
- <sup>42</sup> Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12th August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.







Analytica Chimica Acta  
Volume 752, 8 November 2012, Pages 62–68



## ENANTIOMER-SPECIFIC DETERMINATION OF HEXABROMOCYCLODODECANE IN FISH BY SUPRAMOLECULAR SOLVENT-BASED SINGLE-STEP SAMPLE TREATMENT AND LIQUID CHROMATOGRAPHY–TANDEM MASS SPECTROMETRY

A. B. Lara, C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio

*Department of Analytical Chemistry, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, University of Córdoba, Edificio Anexo Marie Curie, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain*

### ABSTRACT

A single-step, environmentally friendly sample treatment was developed and used in combination with liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for the quantitation of hexabromocyclododecane (HBCD) stereoisomers in fish. It was based on the microextraction of the stereoisomers with a supramolecular solvent (SUPRAS) made up of reverse aggregates of decanoic acid (DeA). The procedure involved the stirring of the fish sample (750 mg) with 600  $\mu\text{L}$  of SUPRAS for five minutes, subsequent centrifugation for extract separation from matrix components and direct analysis of the extract after dilution 1:1 with methanol. Individual enantiomers of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD were separated on a chiral stationary phase of  $\beta$ -cyclodextrin and quantified by monitoring of the  $[\text{M}-\text{H}]^- \rightarrow \text{Br}^-$  transition at  $m/z$  640.9  $\rightarrow$  80.9. Driving forces for the microextraction of HBCD in the SUPRAS involved both dispersion and dipole–dipole interactions. Quantitation limits for the determination of individual HBCD enantiomers in hake, cod, sole, panga, whiting and sea bass were within the

intervals 0.5-3.4 ng g<sup>-1</sup>, 0.9-2.5 ng g<sup>-1</sup>, 0.6-1.4 ng g<sup>-1</sup>, 1.0-5.6 ng g<sup>-1</sup>, 0.8-1.3 ng g<sup>-1</sup> and 0.5-3.5 ng g<sup>-1</sup>, respectively. Recoveries for fish samples fortified at the ng g<sup>-1</sup> level ranged between 87 and 114% with relative standard deviations from 1 to 10%. The sample treatment proposed greatly simplifies current procedures for extraction of HBCD stereoisomers and is a useful tool for the development of a large scale database for their presence in fish.

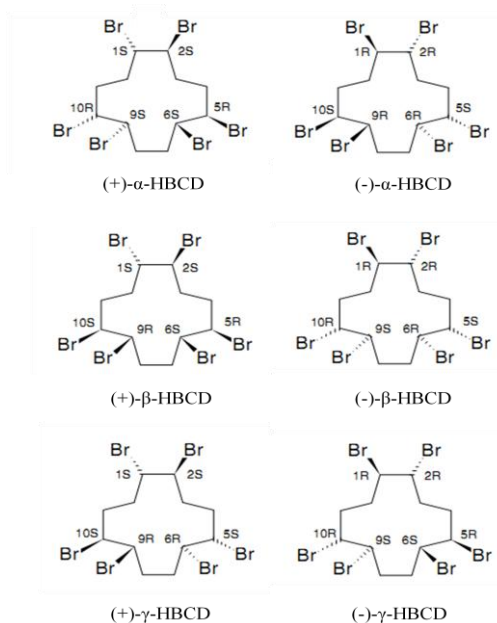
*Keywords:* Supramolecular solvent, microextraction, chiral analysis, hexabromocyclododecane, fish samples.

## 1. INTRODUCTION

Hexabromocyclododecane (HBCD) is an emerging contaminant of very high concern because of its environmental persistence, bioaccumulative properties<sup>1</sup> and adverse effects, mainly derived from its neurotoxic,<sup>2</sup> carcinogenic,<sup>3</sup> and endocrine-disrupting<sup>4</sup> character. The commercial HBCD primarily consists of racemic mixtures of three diastereoisomeric pairs of enantiomers (Fig. 1), the  $\gamma$ -isomer being the most abundant (75-89%), followed by the  $\alpha$ - (10-13%) and  $\beta$ - (0.5-12%) isomers.<sup>5</sup> It is used as an additive in polystyrene foams for thermal insulation of buildings, in upholstery textiles and in electrical equipment housings.<sup>6</sup> Similarly to other brominated flame retardants (BFRs) such as polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) or polybrominated biphenyls (PBBs), HBCD reduces the risk of fire by releasing bromine free radicals under heating that scavenge other free radicals taking part in the flame propagation process.<sup>7</sup> HBCD can enter the environment by emission during its production or the manufacture of flame-retarded products, by leaching from consumer products or following disposal.<sup>8</sup> Since the Europe Union prohibited the use of PBDEs and PBBs in 2006,<sup>9</sup> the production of HBCD has continuously raised (it currently exceeds 20,000 tonnes per year),<sup>10</sup> and as a result, the abundance of this pollutant in the environment has steadily increased in the last years.

Fishes are often contaminated with HBCD owing to their low metabolizing capability for this pollutant and their high position in the food chain. HBCD has been found in fishes at concentrations ranging from the low ng g<sup>-1</sup> level to about 20  $\mu$ g g<sup>-1</sup>,<sup>8,11</sup>  $\alpha$ -HBCD being the most abundant isomer in the majority of fish species.<sup>8</sup> Differences in the absorption and metabolism rate between the different diastereoisomers<sup>12</sup> and their bioisomerization, with a preferential formation of the  $\alpha$ -HBCD isomer,<sup>13</sup> have been pointed out as the most probable reasons for alteration of the HBCD composition in fish from that of commercial products. In addition, deviation of the enantiomeric ratios [ERs, defined as the molar ratio of (+)- to (-)-

enantiomers] from their original value (i.e. ER = 1 for racemic mixtures) has been observed for the three diastereoisomeric pairs, the ER values found greatly varying among species and tissues and within populations.<sup>14,15</sup> Enantiomer specific accumulation of HBCD in fish indicates that, similarly to other chiral contaminants,<sup>16,17</sup> the enantiomers may be selectively degraded in biota. To further our understanding of the behaviour and distribution of HBCD stereoisomers in life organisms, which is essential for assessment of their environmental and health risks, analytical methods able to reliably determine HBCD diastereoisomers and enantiomers in biota are required.



**Figura 1.** Stereochemical structures of the three enantiomeric pairs of hexabromocyclododecane (HBCD) diastereoisomers. Bold wedges of parallel lines correspond to bromine groups above and below the drawing plane, respectively.

Total concentration of HBCD has been traditionally determined by gas chromatography (GC) coupled to electron-capture detection (ECD) or mass spectrometry (MS).<sup>8,16</sup> This technique is not suitable for resolution of individual stereoisomers because of their interconversion at temperatures above 160 °C and the fact they do not elute from GC columns at lower temperatures.<sup>10</sup> Liquid chromatography (LC) coupled to tandem mass spectrometry

(MS/MS)<sup>1,15,18-20</sup> has been the choice for isomer- and/or enantiomer-specific analyses by using C<sub>18</sub><sup>1,15,18,19</sup> and  $\beta$ -cyclodextrin<sup>1,11,18</sup> stationary phases, respectively. With regard to the MS detection, triple quadrupole has been the mass analyser more frequently employed,<sup>1,11,15,18-20</sup> and electrospray sources, operating in the negative ion mode, have provided the highest sensitivity.<sup>19</sup> Extraction of HBCD in fish is usually performed by Soxhlet utilising 100-150 mL of pure organic solvents [e.g. ethyl acetate,<sup>11</sup> dichlorometane<sup>20</sup> or their mixtures (e.g. n-hexane/acetone)<sup>15,21</sup>]. Accelerated solvent extraction (ASE)<sup>1,18,19</sup> has been also proposed. ASE spends shorter times than Soxhlet extraction (times are reduced from several hours to a few minutes) but both techniques require clean-up involving multiple steps (typically gel permeation chromatography followed by SPE and/or sulphuric acid treatment)<sup>1,11,15,18-21</sup> before analysing the extracts by LC/MS. Isotopically labelled standards and the standard addition method are usually used for HBCD quantitation.

Supramolecular solvents (SUPRASs) are nanostructured liquids made up of three-dimensional aggregates of amphiphilic compounds that have outstanding properties for analytical extractions. Among them, should emphasize their ability to effectively extract compounds in a wide polarity range from both liquid and solid samples, and their low volatility and inflammability, which permits development of extraction processes safer and more environmentally friendly than those based on the use of organic solvents. SUPRASs generated from aqueous solutions of non-ionic surfactants at temperatures above a threshold value (the cloud point)<sup>22,23</sup> have been extensively used to extract both inorganic and organic compounds, primarily from environmental and biological liquid samples,<sup>24,25</sup> while ionic surfactant-based SUPRASs<sup>26,27</sup> have not been extensively applied.<sup>28,29</sup> Recently, alkyl carboxylic acid-based SUPRASs made up of vesicular and inverse aggregates have been described<sup>30,31</sup> and successfully applied to the extraction of a variety of contaminants (viz. PAHs,<sup>32,33</sup> phenols,<sup>34</sup> bisphenols,<sup>32</sup> pesticides,<sup>35</sup> bioactive compounds,<sup>36</sup> dyes<sup>37</sup> and mycotoxins<sup>32</sup>) in aqueous environmental<sup>33-35</sup> and food<sup>32,36,37</sup> samples. SUPRASs have not been used in enantiomer-selective analysis so far.

In this research, a SUPRAS synthesized by a self-assembly process from the mixing of decanoic acid, THF and water, was assessed for the microextraction of HBCD in fish prior to its enantiomer-specific determination by LC-MS/MS. The main results obtained are presented and discussed below.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Standards and reagents

All chemicals were of analytical reagent-grade and were used as supplied. Decanoic acid (DeA) was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Individual HBCD isomers ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) were obtained from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) and  $^{13}\text{C}_{12}$ -labelled HBCD isomers, used as internal standards (IS), were supplied by Wellington Labs. (Guelph, Canada). Both unlabelled and labeled standards were supplied as racemic solutions in toluene, the former of  $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  (97% purity) and the latter of  $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  (98% purity). Working IS ( $2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and HBCD ( $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) isomer standard solutions were prepared in methanol and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . They were stable for at least 3 months. LC-grade tetrahydrofuran (THF) was obtained from Panreac (Barcelona, Spain), and LC-grade water, acetonitrile and methanol from Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.2. Apparatus

The LC-MS system used was a hybrid triple quadrupole/linear ion trap (Applied Biosystems MSD Sciex 4000QTRAP, Foster City, CA, USA) coupled to a liquid chromatograph Agilent HP 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with a TurbolonSpray (TIS) interface. All data were acquired and processed using the Analyst 1.5.1 Software. The separation of the HBCD enantiomers was performed on a chiral column Nucleodex  $\beta$ -PM (200 mm $\times$ 4.0 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) from Macherey-Nagel (Düren, Germany). A magnetic stirrer Basicmagmix from Ovan (Barcelona, Spain) and a digitally regulated centrifuge Mixtasel equipped with an angle rotor 4x100 mL (ref. 7001326) from JP-Selecta (Abrera, Spain) were used for SUPRAS production. A homogenizer-disperser Ultra-Turrax T25 Basic from Ika-Werke (Staufen, Germany), a vortex-shaker REAX Top equipped with an attachment (ref. 549-01000-00) for 10 microtubes from Heidolph (Schwabach, Germany) and a high speed brushless centrifuge MPW-350R equipped with an angle rotor 36x2.2/1.5 mL (ref. 11462) from MPW Med-Instruments (Warszaw, Poland) were used for sample preparation.

### 2.3. Supramolecular solvent production

The following procedure, which permits to obtain a SUPRAS volume ( $\sim 8.5\text{ mL}$ ) able to treat 14 fish samples, was routinely followed. DeA (6.5 g) was dissolved in THF (4.2 mL) in a 100 mL-glass centrifuge tube. Then, 80 mL of a 10 mM hydrochloric acid aqueous solution were

added. The mixture was magnetically stirred for 5 min, time in which the SUPRAS spontaneously formed in the bulk solution, and centrifuged at 3,500 rpm for 10 min to speed solvent separation up. Next, it was withdrawn using a 10 mL-syringe, transferred to a hermetically closed storage glass vial to avoid THF losses and stored at 4 °C. Under these conditions, the solvent produced was stable for at least one month. The volume of solvent obtained can be adjusted at will by choosing an appropriate, constant DeA/THF/water proportion.

## 2.4. Analysis of fish

### 2.4.1. Sample pretreatment

Different species of fish (i.e. hake, cod, sole, panga, whiting and sea bass) were analyzed. The fish samples were acquired from local markets in Córdoba (Spain). The head, fishbone and backbones of fishes were removed and the muscles were filleted. Cleaned fishes were stored at -20 °C until analysis. After thawing, about 200 g of sample were chopped and homogenized using a homogenizer-disperser. Then, portions of about 750 mg were taken for analysis and recovery experiments, which were performed in triplicate. Spiking of samples was made by adding minute volumes of the working HBCD standard solution (6-240 µL) or of a 1 µg mL<sup>-1</sup> γ-HBCD methanolic solution (20-80 µL). Spiked samples were allowed to stand at room temperature for 30 min before analysis.

### 2.4.2. Microextraction of HBCD

About 750 mg of chopped sample and 600 µL of SUPRAS were mixed in a 2 mL-microtube Safe-Lock from Eppendorf Ibérica (Madrid, Spain). A micro Teflon-coated bar (3x10 mm) was introduced in the microtube to favour sample dispersion during extraction, which was made by vortex-shaking at 2,500 rpm for 5 min. Then, the mixture, thermostated at 10 °C, was centrifuged at 15,000 rpm (16,720xg) for 10 min. Finally, four aliquots of 50 µL of approximately 250-300µL of supernatant were withdrawn using a 50µL microsyringe and each one transferred to a 2 mL-microtube.

### 2.4.3. Quantitation of HBCD enantiomers by LC QqQ-MS/MS

Separation and quantification of HBCDs were performed by LC coupled to a TurbolonSpray (TIS) source, operating in the negative ion mode, and triple quadrupole (QqQ) mass analyzer.

The injection volume was 10  $\mu\text{L}$ . The mobile phase consisted of acetonitrile/methanol (70:30 v/v) (A) and water/methanol (70:30 v/v) (B). The elution program was a linear gradient from 50:50 A:B to 90:10 A:B over the first 8 min, 90:10 A:B through the next 10 min and then 100% A for 3 min. Reconditioning the column took about 10 min. The flow-rate of the mobile phase and the temperature of the column were kept constant at 0.3 mL min<sup>-1</sup> and 40°C, respectively. The diver valve was programmed to send the mobile phase containing DeA and the most polar matrix compounds to waste. The eluted components were sent to the ionisation source 15 min after the beginning of the run. The elution order of each enantiomer was assigned according to Janák et al.<sup>15</sup>

Identification and quantitation of analytes were performed operating in the selected reaction monitoring (SRM) mode using the  $[\text{M}-\text{H}]^+ \rightarrow \text{Br}^+$  transitions at  $m/z$  640.9 $\rightarrow$ 78.9 (quantifier ion) and 640.9 $\rightarrow$ 80.9 (qualifier ion). The IS was monitored at the  $m/z$  652.6 $\rightarrow$ 80.9 transition. The instrumental parameters in the TIS source and analyzer were optimized to obtain the highest relative intensity. The TIS source values were as follows: curtain and nebulizer gas, 50 psi; turbo gas, 10 psi; temperature of the turbo gas, 350 °C; ion spray voltage, -4,500 V; entrance potential, 10 V; and declustering potential, -85 V for analytes and -35 V for ISs. The analyzer settings were as follows: 1.0 unit resolution for the first and third quadrupoles; collision gas,  $3.0 \times 10^{-5}$  Torr; collision energy, -48, -32 and -72 V; and collision cell exit potential, -17, -7 and -1 V for the transitions 640.9 $\rightarrow$ 80.9, 640.9 $\rightarrow$ 78.9 and 652.6 $\rightarrow$ 80.9, respectively. Quantitation of the target analytes was performed using the standard addition method. For this purpose, solutions ( $n=4$ ) were prepared by adding to 50  $\mu\text{L}$  of sample extract, 10  $\mu\text{L}$  of the IS solution, volumes of the HBCD standard solution to obtain amounts of each enantiomer of 0, 0.25, 25 and 50 ng and methanol to achieve a final volume of 100  $\mu\text{L}$ . The concentration of the HBCD stereoisomers in extracts were calculated from calibration curves obtained by plotting peak area ratios  $[A/A_{\text{IS}}]$ ;  $A$  = peak area of individual stereoisomers and  $A_{\text{IS}}$  = peak area of the corresponding internal standard, namely,  $^{13}\text{C}_{12}$ -(+)- $\gamma$ -HBCD for (+)- $\alpha$ -, (-)- $\alpha$ -, (+)- $\beta$ -, (-)- $\beta$ - and (+)- $\gamma$ -HBCD, and  $^{13}\text{C}_{12}$ -(-)- $\gamma$ -HBCD for (-)- $\gamma$ -HBCD] versus the amount of HBCD injected.

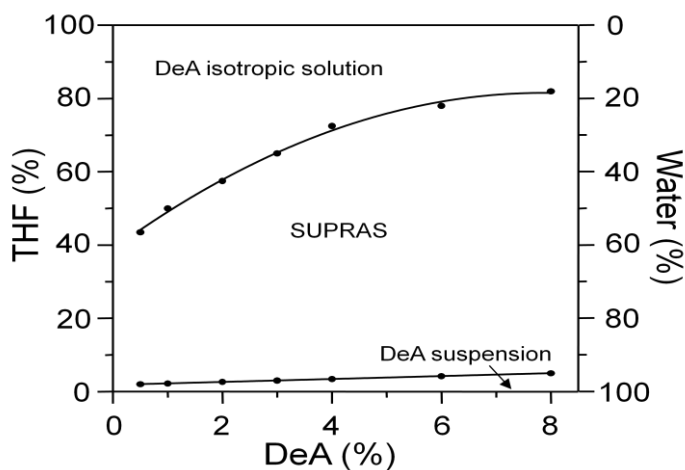


### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Microextraction of HBCD

##### 3.1.1. Description, synthesis and binding capability of the SUPRAS

The SUPRAS used for the microextraction of HBCD in fish was a nanostructured liquid made up of DeA, THF and water. DeA molecules spontaneously assembled in the solvent mixture at room temperature to give three-dimensional aggregates with their hydrocarbon chains extended into and surrounded by THF and their carboxylic groups solvated by water in the interior of the assemblies. The pH of the water used in the synthesis was kept below 4 to prevent DeA from deprotonation ( $pK_a = 4.8 \pm 0.2$ ), and consequently, from solubilisation in the hydro-organic phase in equilibrium with the SUPRAS. The boundaries of the SUPRAS region for DeA/THF/water mixtures are depicted in Figure 2. Below these boundaries the DeA precipitated and above them, the density of DeA aggregates was similar to that of the equilibrium phase and an isotropic solution was obtained.



**Figura 2.** Diagram of phase boundaries for ternary mixtures of decanoic acid, tetrahydrofuran and water at room temperature.

Because of the apolar character of HBCD ( $\log K_{ow} = 5.07, 5.12$  and  $5.5$  for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD, respectively),<sup>38</sup> dispersion interactions between the hydrophobic moieties of the target analytes and the hydrocarbon chains of the DeA molecules forming aggregates in the

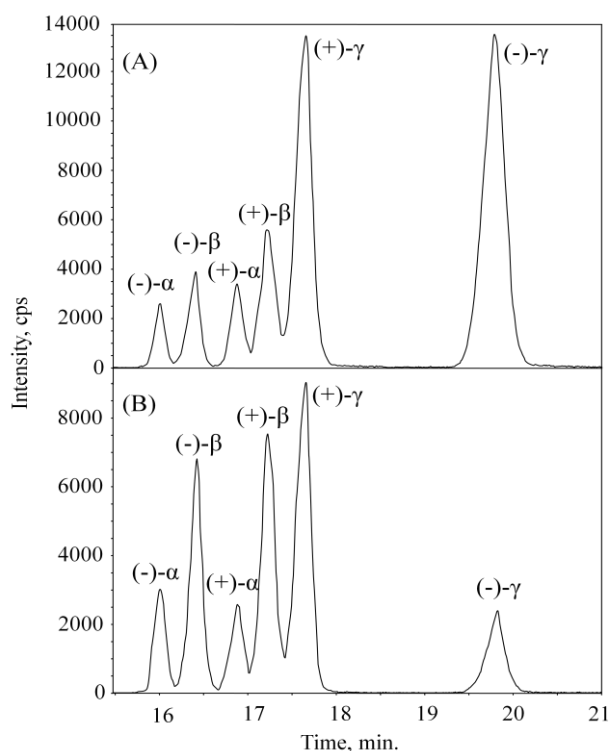
SUPRAS were expected to be the main driving forces for the microextraction of HBCD in the solvent, although dipole-dipole interactions between the bromine groups of the target analytes and the carboxylic groups of DeA could also occur.

### 3.1.2. Optimization

The optimization of the experimental variables used for microextraction was performed by extracting blank samples of hake muscle spiked with racemic  $\gamma$ -HBCD (100 ng g<sup>-1</sup>) and determining the extraction yields obtained for the two  $\gamma$ -HBCD enantiomers [(+)- and (-)- $\gamma$ -HBCD]. They were selected as representative of the three pairs of enantiomers on the basis of their chromatographic behaviour (see Figure 3). It was checked that the time of contact between analytes and the fish muscle in spiked-samples did not influence the recovery in the interval tested (30 min-24 h). The variables investigated were composition and volume of SUPRAS, amount of sample, and times of vortex-shake and centrifugation. Their effect on the extraction efficiency of the target analytes was studied by changing them in turn while keeping the others constant.

The composition of the SUPRAS varied with both the THF/water ratio and the pH used to generate it. The former determined the amount of DeA per unit volume in the solvent and the latter, the concentration of hydrogen ions in the aqueous pool inside the biosurfactant aggregates. On the other hand, the volume of SUPRAS generated through the self-assembly process depended linearly and exponentially on the amount of DeA and percentage of THF, respectively, in the bulk solution, according to the equation  $y = (1.04 \pm 0.02)a e^{(0.0473 \pm 0.0009)b}$ , where  $y$  is the volume of SUPRAS in  $\mu\text{L}$ ,  $a$  the amount of DeA in mg and  $b$  the THF percentage (v/v).

The influence of solvent composition on the extraction efficiency of  $\gamma$ -HBCD from hake samples was assessed using 600  $\mu\text{L}$  of SUPRASs containing from 0.21 mg  $\mu\text{L}^{-1}$  to 0.76 mg  $\mu\text{L}^{-1}$  of DeA, which were produced in solutions with THF/water volume ratios ranging from 0.052 to 0.427.  $\gamma$ -HBCD isomers were quantitatively extracted in the whole range of solvent composition tested, so using the minimal amount of THF (i.e. THF/water = 0.052) in the self-assembly process was the criterion used for solvent selection. The pH of the water solution at which the SUPRAS was synthesized, adjusted with hydrochloric acid in the range 10<sup>-4</sup>-0.1 M, did not affected the extraction efficiency of  $\gamma$ -HBCD isomers. A pH value of 2 was selected to ensure complete protonation of DeA. Section 2.3 gives the whole experimental conditions to synthesize the solvent selected for extracting HBCD isomers in fish.



**Figura 3.** LC-MS/MS chromatograms obtained fish [(A) cod and (B) sea bass] samples spiked with 400 ng g<sup>-1</sup> of each HBCD stereoisomer.

The effect of the volume (600 to 1,000 µL) of the SUPRAS selected on the extraction yield of HBCD was assessed by using 750 mg-hake spiked samples. Volumes below 600 µL did not give sufficient extract for HBCD determination. Recoveries nearly 100% were obtained in the range of solvent volume/sample amount ratios assayed (i.e. 0.8-1.3), that confirming the high extraction ability of the SUPRAS. The amount of sample used for extraction (interval tested 200-800 mg) did not affect extraction yield provided that the solvent volume/sample amount ratios were within the interval mentioned above.

The high solubility of HBCD isomers in the SUPRAS facilitated the rapid transfer of analytes from the fish sample to the solvent; 5 min of vortex shaking-assisted extraction (vibration motion = 2,500 rpm) were only required to quantitatively extract the target compounds from

hake samples (Table 1). Effective separation of sample particles from SUPRAS was reached after centrifugation at 15,000 rpm for 10 min.

**Table 1.** Mean recoveries<sup>a</sup> and standard deviations (n=3) obtained for (+)- and (-)- $\gamma$ -HBCD using different extraction times

Extraction time (min)	Recovery $\pm$ s (%)	
	(+)- $\gamma$ -HBCD	(-)- $\gamma$ -HBCD
1	61 $\pm$ 5	53 $\pm$ 3
2	90 $\pm$ 3	91 $\pm$ 9
5	101 $\pm$ 10	100 $\pm$ 8
10	109 $\pm$ 9	105 $\pm$ 3

<sup>a</sup>750 mg of hake sample spiked with 100 ng g<sup>-1</sup> of racemic  $\gamma$ -HBCD;  
Volume of SUPRAS = 600  $\mu$ L; Vibration motion = 2500 rpm

### 3.2. Quantitation of individual HBCD enantiomers by LC-MS/MS

The chromatographic behaviour and the response of the mass detector for both analytes and internal standards was investigated in methanol and 1:1 methanol:SUPRAS. As it was specified in section 2.4.3, SUPRAS components were sent to waste before entering the ionization source to prevent it from getting dirty. Retention time and mass response were identical in both methanol and the methanol:SUPRAS mixture for the different enantiomers, that indicating that solvent components did not affect HBCD determination. Both analytes and ISs eluted at the same retention time but the response in the mass detector for the ISs was always higher and independent of the concentration of analyte within the linear calibration range (0-500 ng mL<sup>-1</sup>).

Ionization suppression was observed for HBCD stereoisomers, both analytes and ISs, in sample extracts, the effect being higher for the formers. Dilution with methanol (1:1, v/v) increased the instrumental signal but did not completely prevent the effect of interferences. No signal improvement was obtained by further dilution. Two different calibration methods, namely use of isotope-labelled internal standards (ISs) and the standard addition method, were assessed to correct matrix effects

The internal standard method was evaluated by extracting a 750 mg-blank hake sample according to the procedure described in the Section 2.4.2. Standard solutions containing a constant concentration ( $200 \text{ ng mL}^{-1}$ ) of  $^{13}\text{C}_{12}$ -labelled  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD and variable HBCD concentrations ( $0\text{--}500 \text{ ng mL}^{-1}$  of each enantiomer) were prepared in both 1:1 (v/v) methanol/SUPRAS and 1:1 (v/v) methanol/sample extract. Then, calibrations curves were constructed for each HBCD enantiomer from both sets of standard solutions by plotting the peak area ratios  $[A/A_{IS}; A = \text{peak area of individual stereoisomers and } A_{IS} = \text{peak area of the corresponding internal standard}]$  versus the amount of HBCD injected. The slopes of the calibration graphs obtained from standards containing sample extracts were different to those achieved from standards in SUPRAS/methanol (Table 2), and therefore, it can be concluded that the use of isotope labelled ISs did not correct signal variations due to matrix effects.

For the standard addition method, a unique labelled HBCD isomer ( $^{13}\text{C}_{12}$ -labelled  $\gamma$ -HBCD) was used as internal standard.  $^{13}\text{C}_{12}$ -(+)- $\gamma$ -HBCD was used as an IS for (+)- $\alpha$ -, (-)- $\alpha$ -, (+)- $\beta$ -, (-)- $\beta$ - and (+)- $\gamma$ -HBCD, whereas  $^{13}\text{C}_{12}$ -(-)- $\gamma$ -HBCD was used for (-)- $\gamma$ -HBCD. Calibration levels ( $n=4$ , concentration of each HBCD enantiomer = 0, 25, 250 and  $500 \text{ ng mL}^{-1}$ ) were prepared from 1:1 (v/v) methanol/sample extracts. Table 3 shows the slopes of the calibration graphs obtained for a variety of fishes. The slope value was clearly dependent on the composition of the fish sample, so reliable quantitation of the HBCD isomers requires the use of the standard addition method.

Detection (LODs) and quantitation (LOQs) limits for individual HBCD enantiomers were calculated from sample blanks taking into account a signal-to noise ratio of 3 and 10, respectively. LODs and LOQs varied within the intervals  $0.3\text{--}1.7 \text{ ng g}^{-1}$  and  $1.0\text{--}5.6 \text{ ng g}^{-1}$  for panga,  $0.3\text{--}0.4 \text{ ng g}^{-1}$  and  $0.8\text{--}1.3 \text{ ng g}^{-1}$  for whiting,  $0.2\text{--}0.4 \text{ ng g}^{-1}$  and  $0.6\text{--}1.4 \text{ ng g}^{-1}$  for sole,  $0.3\text{--}0.7 \text{ ng g}^{-1}$  and  $0.9\text{--}2.5 \text{ ng g}^{-1}$  for cod and  $0.1\text{--}0.9 \text{ ng g}^{-1}$  and  $0.5\text{--}3.4 \text{ ng g}^{-1}$  for hake, and  $0.1\text{--}1.0 \text{ ng g}^{-1}$  and  $0.5\text{--}3.5 \text{ ng g}^{-1}$  for sea bass, respectively.

The precision was assessed by analysing 6 independent panga samples spiked with HBCD at two concentration levels: 20 and  $400 \text{ ng g}^{-1}$  of each enantiomer. The relative standard deviations varied within the intervals 2.8–7.9 % and 1.8–5.8%, respectively.

**Table 2.** Retention times and calibration parameters obtained from standards in SUPRAS/methanol (1:1, v/v) and in sample extract/methanol (1:1, v/v) for the HBCD stereoisomers investigated with and without the use of isotope-labeled internal standards.

HBCD stereoisomer	Retention time (min)	Calibration parameters	Without isotope-labeled IS		With isotope-labeled IS	
			SUPRAS/methanol	Extract/methanol	SUPRAS/methanol	Extract/methanol
(+) - $\alpha$	16.9	Slope $\pm$ s ( $\mu\text{g}^{-1}$ )	(15.3 $\pm$ 0.02) $\times 10^6$	(4.2 $\pm$ 0.2) $\times 10^6$	(2.44 $\pm$ 0.02) $\times 10^2$	(1.66 $\pm$ 0.01) $\times 10^2$
		$r^a$	0.9997	0.996	0.9998	0.99992
(-) - $\alpha$	16.0	Sx/y <sup>b</sup> $\times 10^2$	9.7	8.7	1.2	0.5
		Slope $\pm$ s ( $\mu\text{g}^{-1}$ )	(14.9 $\pm$ 0.05) $\times 10^6$	(4.85 $\pm$ 0.04) $\times 10^6$	(2.24 $\pm$ 0.02) $\times 10^2$	(1.35 $\pm$ 0.02) $\times 10^2$
(+)- $\beta$	17.3	$r^a$	0.998	0.9990	0.9998	0.9994
		Sx/y <sup>b</sup> $\times 10^2$	21.8	1.8	0.8	1.0
(-)- $\beta$	16.4	Slope $\pm$ s ( $\mu\text{g}^{-1}$ )	(23.2 $\pm$ 0.09) $\times 10^6$	(8.3 $\pm$ 0.1) $\times 10^6$	(6.58 $\pm$ 0.03) $\times 10^2$	(4.74 $\pm$ 0.04) $\times 10^2$
		$r^a$	0.998	0.9994	0.9996	0.9998
(+)- $\gamma$	17.7	Sx/y <sup>b</sup> $\times 10^2$	39.6	4.7	1.3	1.9
		Slope $\pm$ s ( $\mu\text{g}^{-1}$ )	(20.9 $\pm$ 0.06) $\times 10^6$	(6.6 $\pm$ 0.1) $\times 10^6$	(6.62 $\pm$ 0.07) $\times 10^2$	(4.63 $\pm$ 0.06) $\times 10^2$
(-)- $\gamma$	19.8	$r^a$	0.9990	0.9994	0.9997	0.9996
		Sx/y <sup>b</sup> $\times 10^2$	24.7	5.6	3.2	2.9
(+)- $\gamma$	17.7	Slope $\pm$ s ( $\mu\text{g}^{-1}$ )	(44 $\pm$ 1) $\times 10^6$	(20.7 $\pm$ 0.2) $\times 10^6$	(2.78 $\pm$ 0.02) $\times 10^2$	(2.51 $\pm$ 0.04) $\times 10^2$
		$r^a$	0.992	0.9998	0.9998	0.9997
(-)- $\gamma$	19.8	Sx/y <sup>b</sup> $\times 10^2$	44.3	10.7	1.1	1.1
		Slope $\pm$ s ( $\mu\text{g}^{-1}$ )	(39.1 $\pm$ 0.8) $\times 10^6$	(18.2 $\pm$ 0.7) $\times 10^6$	(3.23 $\pm$ 0.02) $\times 10^2$	(2.75 $\pm$ 0.03) $\times 10^2$
(+)- $\gamma$	17.7	$r^a$	0.9993	0.998	0.9995	0.9998
		Sx/y <sup>b</sup> $\times 10^2$	35.7	29.2	0.7	0.8

<sup>a</sup> Correlation coefficient, n=4.

<sup>b</sup> Standard error of the estimate.

**Table 3.** Standard addition calibration (SAC) parameters for the HBCD stereoisomers investigated in fish using the standard addition method.

Fish	Calibration parameters	HBCD stereoisomer					
		(+)- $\alpha$	(-)- $\alpha$	(+)- $\beta$	(-)- $\beta$	(+)- $\gamma$	(-)- $\gamma$
Hake	Slope $\pm$ s ( $\mu\text{g}^{-1}$ )	58.3 $\pm$ 2	67.9 $\pm$ 1	86.8 $\pm$ 1	80.6 $\pm$ 2	251 $\pm$ 4	275 $\pm$ 3
	$r^a$	0.9991	0.9997	0.9998	0.9994	0.9997	0.9998
	Sx/y <sup>b</sup> x102	0.43	0.29	0.32	0.44	1.06	0.80
Cod	Slope $\pm$ s ( $\mu\text{g}^{-1}$ )	45.5 $\pm$ 1	32.5 $\pm$ 1	89.7 $\pm$ 6	52.7 $\pm$ 2	227 $\pm$ 2	277 $\pm$ 6
	$r^a$	0.9997	0.9992	0.997	0.9994	0.9992	0.9997
	Sx/y <sup>b</sup> x102	0.13	0.16	0.99	0.15	0.17	0.53
Sole	Slope $\pm$ s ( $\mu\text{g}^{-1}$ )	59.8 $\pm$ 1	59.6 $\pm$ 0.	180 $\pm$ 2	133 $\pm$ 1	219 $\pm$ 4	240 $\pm$ 0.
	$r^a$	0.9996	0.9998	0.99991	0.9999	0.9996	0.9991
	Sx/y <sup>b</sup> x102	0.21	0.12	0.29	0.11	0.73	1.27
Panga	Slope $\pm$ s ( $\mu\text{g}^{-1}$ )	80.3 $\pm$ 1	55.3 $\pm$ 0.	103 $\pm$ 2	99.2 $\pm$ 2	251 $\pm$ 7	293 $\pm$ 13
	$r^a$	0.9996	0.9997	0.9994	0.9995	0.9992	0.998
	Sx/y <sup>b</sup> x102	0.25	0.16	0.43	0.36	1.23	2.24
Whiti	Slope $\pm$ s ( $\mu\text{g}^{-1}$ )	51.1 $\pm$ 1	53.5 $\pm$ 1.3	113 $\pm$ 2	74.2 $\pm$ 2	209 $\pm$ 5	243 $\pm$ 4
	$r^a$	0.9996	0.9993	0.9996	0.9992	0.9994	0.9997
	Sx/y <sup>b</sup> x102	0.18	0.24	0.42	0.36	0.95	0.76
Sea	Slope $\pm$ s ( $\mu\text{g}^{-1}$ )	61.6 $\pm$ 1.7	93.2 $\pm$ 1.2	314 $\pm$ 7	261 $\pm$ 10	382 $\pm$ 11	383 $\pm$ 1
	$r^a$	0.9993	0.9998	0.9995	0.9990	0.9992	1.0000
	Sx/y <sup>b</sup> x102	0.30	0.23	0.12	1.73	0.19	0.11

<sup>a</sup>Correlation coefficient, n = 4<sup>b</sup>Standard error of the estimate

### 3.3. Analysis of fish samples

The developed method was used for the enantiomer-specific quantification of HBCD in both non-fortified and fortified samples of hake, cod, sole, panga, whiting and sea bass, bought in local supermarkets in Córdoba (Spain). Hake samples were fortified with HBCD enantiomers at four concentration levels, i.e. 20, 80, 400 and 800 ng g<sup>-1</sup>, and the rest of fish samples at two concentration levels, i.e. 20 and 400 ng g<sup>-1</sup>.

**Table 4.** Recovery and enantiomeric ratio of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD from spiked fish samples

Sample	Concentration added <sup>a</sup> (ng g <sup>-1</sup> )	Recovery $\pm$ s (%)				Enantiomeric ratio			
		(+)- $\alpha$	(-)- $\alpha$	(+)- $\beta$	(-)- $\beta$	(+)- $\gamma$	(-)- $\gamma$	$\alpha$	$\gamma$
Hake	20	98 $\pm$ 5	102 $\pm$ 2	101 $\pm$ 4	103 $\pm$ 5	104 $\pm$ 3	98 $\pm$ 9	0.96 $\pm$ 0.05	1.06 $\pm$ 0.07
	80	108 $\pm$ 3	114 $\pm$ 9	112 $\pm$ 5	111 $\pm$ 5	109 $\pm$ 6	104 $\pm$ 10	0.96 $\pm$ 0.08	1.0 $\pm$ 0.1
	400	99 $\pm$ 2	97 $\pm$ 6	101 $\pm$ 4	92 $\pm$ 7	94 $\pm$ 4	95 $\pm$ 5	1.02 $\pm$ 0.07	0.99 $\pm$ 0.07
	800	95 $\pm$ 2	100 $\pm$ 5	98 $\pm$ 3	99 $\pm$ 3	102 $\pm$ 2	103 $\pm$ 6	0.95 $\pm$ 0.05	0.99 $\pm$ 0.06
Panga	20	99 $\pm$ 3	102 $\pm$ 4	103 $\pm$ 4	104 $\pm$ 10	101 $\pm$ 7	99 $\pm$ 5	0.97 $\pm$ 0.03	1.02 $\pm$ 0.09
	400	104 $\pm$ 5	97 $\pm$ 4	100 $\pm$ 1	103 $\pm$ 9	98 $\pm$ 2	100 $\pm$ 10	1.08 $\pm$ 0.09	0.99 $\pm$ 0.09
Cod	20	94 $\pm$ 3	98 $\pm$ 6	102 $\pm$ 3	99 $\pm$ 3	102 $\pm$ 5	100 $\pm$ 1	0.97 $\pm$ 0.03	1.02 $\pm$ 0.04
	400	93 $\pm$ 1	93 $\pm$ 5	96 $\pm$ 5	96 $\pm$ 2	100 $\pm$ 4	100 $\pm$ 2	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.06
Whiting	20	101 $\pm$ 2	97 $\pm$ 7	105 $\pm$ 3	96 $\pm$ 6	108 $\pm$ 4	102 $\pm$ 2	1.04 $\pm$ 0.07	1.05 $\pm$ 0.05
	400	99 $\pm$ 6	102 $\pm$ 2	100 $\pm$ 1	99 $\pm$ 5	94 $\pm$ 4	99 $\pm$ 8	0.98 $\pm$ 0.04	0.96 $\pm$ 0.04
Sole	20	98 $\pm$ 3	95 $\pm$ 1	102 $\pm$ 3	106 $\pm$ 10	102 $\pm$ 3	103 $\pm$ 8	1.03 $\pm$ 0.03	0.99 $\pm$ 0.04
	400	100 $\pm$ 3	95 $\pm$ 4	96 $\pm$ 1	94 $\pm$ 3	96 $\pm$ 4	94 $\pm$ 5	1.05 $\pm$ 0.06	1.02 $\pm$ 0.08
Sea bass	20	96 $\pm$ 2	96 $\pm$ 3	94 $\pm$ 4	95 $\pm$ 5	92 $\pm$ 2	87 $\pm$ 6	1.00 $\pm$ 0.01	1.05 $\pm$ 0.07
	400	94 $\pm$ 1	95 $\pm$ 2	101 $\pm$ 4	96 $\pm$ 5	99 $\pm$ 3	94 $\pm$ 2	1.00 $\pm$ 0.03	1.03 $\pm$ 0.03

<sup>a</sup>Concentration of each HBCD enantiómero



No HBCD was detected in the non-spiked samples tested. The recoveries and enantiomeric ratios obtained from the analysis of spiked samples are shown in Table 4. Recoveries ranged from 87 to 114% with relative standard deviations from 1 to 10% (conventional criteria for the analysis of contaminants in biological samples demands an average recovery between 70 and 120%, provided that the RSDs values are <30%). Enantiomeric fraction no significantly different from 1 were obtained for the three HBCD isomers in all the samples analyzed which demonstrated the feasibility of the proposed method for the stereoselective determination of this contaminant in fish. Figure 3 shows the chromatograms obtained from fortified (A) cod and (B) sea bass samples.

#### 4. CONCLUSIONS

A SUPRAS made up of reverse aggregates of decanoic acid, containing high concentration of this surfactant ( $0.76 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ ), was proven to quantitatively extract HBCD enantiomers from fish in a short time (5 min) using conventional lab equipments. The method required a very low volume of SUPRAS ( $600 \text{ } \mu\text{L}$  per analysis) which permitted to achieve detection and quantitation limits at the low  $\text{ng g}^{-1}$  level without the need for sample preconcentration. The extract was large enough to provide the required number of aliquots to apply the standard addition method for quantitation of the six HBCD isomers using a single small size sample (750 mg of fish). No clean-up steps were applied, that rendering the procedure very simple. Extracts were compatible with the chiral stationary phase used for enantiomer separation. Recoveries were independent of most of experimental parameters, so the method was very robust. Because of its simplicity and efficiency, the sample treatment procedure developed meets the requirements to be used on a routine basis in combination with LC tandem MS.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MICINN (Project CTQ2011-23849) and from the Andalusian Government (Junta de Andalucía, Spain, Project P09-FQM-5151). FEDER also provided additional funding. C. Caballo acknowledges the Andalusian CICYE for a postgraduate fellowship.

## REFERENCES

- <sup>1</sup> G.T. Tomy, W. Budakowski, T. Halldorson, D.M. Whittle, M.J. Keir, C. Marvin, G. Macinnis, M. Alae. *Environ. Sci. Technol.* 39 (2004) 2298-2303.
- <sup>2</sup> E. Mariussen, F. Fonnum. *Neurochem. Int.* 43 (2003) 533-542.
- <sup>3</sup> D. Ronisz, E. Farnen Finne, H. Karlsson, L. Förlin, *Aquat. Toxicol.* 69 (2004) 229-245.
- <sup>4</sup> T. Yamada-Okabe, H. Sakai, Y. Kashima, H. Yamada-Okabe. *Toxicol. Lett.* 155 (2005) 127-133.
- <sup>5</sup> M. Peled, R. Scharia, D. Sondack. In: *Advances in organobromine chemistry II*. J.R. Desmurs, B. Féard, M.J. Goldstein (eds). Elsevier, Amsterdam, 1995. pp 92-99.
- <sup>6</sup> M. Alae, P. Arias, A. Sjödin, Å. Bergman. *Environ. Int.* 29 (2003) 683-689.
- <sup>7</sup> H. Hühnerfuss, M. R. Shah. *J. Chromatogr. A* 1216 (2008) 481-502.
- <sup>8</sup> A. Covaci, A. C. Gerecke, R.J. Law, S. Voorspoels, M. Kohler, N. V. Heeb, H. Leslie, C. R. Allchin, J. De Boer. *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 3679-3688.
- <sup>9</sup> Directive 2006/11/EC of the European Parliament and on the Council of 15 February 2006 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community, Off. J. Eur. Union L64/62, 4.3.2006.
- <sup>10</sup> E. Eljarrat, P. Gerra, D. Barceló. *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 847-861.
- <sup>11</sup> R. Köppen, R. Becker, S. Esslinger, I. Nehls. *Chemosphere*, 80 (2010) 1241-1245.
- <sup>12</sup> K. Law, V.P. Palace, T. Halldorson, R. Danell, K. Wautier, B. Evans, L. Brinkworth, M. Alae, G.T. Tomy. Dietary accumulation of hexabromocyclododecane isomers in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The Third International Workshop on Brominated Flame Retardants, Toronto, 2004, Book of abstracts, 2004, 433-436.
- <sup>13</sup> K. Law, T. Halldorson, R. Danell, V.P. Palace, K. Wautier, B. Evans, L. Brinkworth, M. Whittle, M. Alae, C. Marvin. Evidence of bioisomerization of  $\alpha$ -  $\gamma$ -hexabromocyclododecane (HBCD) isomers in fish. The Third International Workshop on Brominated Flame Retardants, Toronto, 2004, Book of abstracts, 2004, 383-386.

- <sup>14</sup> C. S. Wong. *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 544-558.
- <sup>15</sup> K. Janák, A. Covaci, S. Voorspoels, G. Becher. *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 1987-1994.
- <sup>16</sup> R.J. Law, M. Kohler, N.V. Heeb, A.C. Gerecke, P. Schmid, S. Voorspoels, A. Covaci, G. Becher, K. Janák, C. Thomsen. *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 281A-287A.
- <sup>17</sup> K.L. Willett, E. M. Ulrich, R. A. Hites. *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 2197-2207.
- <sup>18</sup> G.T. Tomy, K. Pleskach, R. Oswald, T. Halldorson, P.A. Helm, G. Macinnis, C.H. Marvin. *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 3634-3639.
- <sup>19</sup> W. Budakowski, G. Tomy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1399-1404.
- <sup>20</sup> D. Ueno, M. Alaei, C. Marvin, D. C.G. Muir, G. Macinnis, E. Reiner, P. Crozier, V.I. Furdui, A. Subramanian, G. Fillmann, P.K.S. Lam, G.J. Zheng, M. Muchtar, H. Razak, M. Prudente, K.-H. Chung, S. Tanabe. *Environ. Pollut.* 144 (2006) 238-247.
- <sup>21</sup> S. Morris, P. Bersuder, C.R. Allchin, B. Zegers, J.P. Boon, P.E.G. Leonards, J. de Boer. *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 343-349.
- <sup>22</sup> H. Ishii, J. Miura, H. Watanabe, *Bunseki Kagaku* 26 (1977) 252-256.
- <sup>23</sup> H. Watanabe, H. Tanaka, *Talanta* 25 (1978) 585-589.
- <sup>24</sup> R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García Pinto, E. Fernández Laespada, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 251-265.
- <sup>25</sup> A. Ballesteros-Gómez, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta* 677 (2010) 108-130.
- <sup>26</sup> I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4519-4526.
- <sup>27</sup> X. Jin, M. Zhu, E.D. Conte, *Anal. Chem.* 71 (1999) 514-517.
- <sup>28</sup> F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 143-154.
- <sup>29</sup> B. K.-W. Man, M. H.-W. Lam, R.K.S. Lam, R.S.S. Wu, G. Shaw, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 3985-3990.
- <sup>30</sup> F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473-7484.

- <sup>31</sup> F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7229-7239.
- <sup>32</sup> A.M. Ballesteros Gómez, S. Rubio, M.D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 530-539.
- <sup>33</sup> A.M. Ballesteros Gómez, S. Rubio, M.D. Pérez-Bendito; *J. Chromatogr. A* 1203 (2008) 168-176.
- <sup>34</sup> F.J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1195 (2008) 25-33.
- <sup>35</sup> A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3740-3745.
- <sup>36</sup> E. M. Costi, M.D. Sicilia, S. Rubio, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6250-6257.
- <sup>37</sup> F.J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Food Chem.* 121 (2010) 763-769.
- <sup>38</sup> J.A. MacGregor, W.B. Nixon. Hexabromocyclododecane (HBCD): Determination of n-octanol/water partition coefficient. 1997; Project No. 439C-104 pp68. Wildlife International Ltd, Easton, Maryland, USA.



## **Capítulo 2**

---

# **Microextracción de piretroides en productos agroalimentarios**



## QUICK AND SENSITIVE ENANTIOSELECTIVE DETERMINATION OF PERMETHRIN IN FRUITS AND VEGETABLES BY COMBINING SUPRAMOLECULAR SOLVENTS AND CHIRAL LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY

A. B. Lara, C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio

*Departamento de Química Analítica, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica IUIQFN, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Marie Curie, E-14071 Córdoba. España.*

### ABSTRACT

Permethrin (PM) is one of the chiral insecticides most widely used around the world. The significant differential toxicity of their four enantiomers, their possible effects to the central nervous system under long-term exposure and the classification of PM as likely to be carcinogenic to humans by ingestion, highlights the need for determination of PM enantiomers. This manuscript firstly reports a LC-MS/MS method for the enantioselective determination of chiral PM in fruits and vegetables. Supramolecular solvents with restricted access properties (SUPRAS-RAM) are proposed as an innovative treatment method that drastically reduce solvent consumption (0.4 mL of SUPRAS-RAM per sample against 15-40 mL of organic solvent per sample) and avoid the need for sample cleanup. Extraction of PM enantiomers is quick (vortexing for 5 min) and efficient (recoveries 93-107%). The method is sensitive (quantification limits from 0.8 to 1.1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and suitable for control of PM enantiomers in agri-food products.

**Keywords:** Supramolecular solvents; chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry; permethrin enantiomers; fruits; vegetables





# **CONCLUSIONES**



Las conclusiones generales obtenidas a partir de las investigaciones desarrolladas en esta Tesis Doctoral son las siguientes:

- ✓ Combinando microextracción con disolventes supramoleculares (SUPRAS) y cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas en tándem (CLQ-MS/MS) es posible desarrollar métodos simples y rápidos para la determinación de estereoisómeros de contaminantes quirales en muestras medioambientales y de alimentos. Los SUPRAS utilizados han sido disolventes constituidos por agregados hexagonales inversos de los anfífilos ácido decanoico y hexanol en tetrahidrofurano (THF)/H<sub>2</sub>O. Se han extraído los estereoisómeros del hexabromociclododecano (HBCD) en muestras medioambientales (suelos, sedimentos, fracción disuelta y particulada de aguas de río y peces) usando SUPRAS de ácido decanoico (Capítulo 1 de la Memoria) y los estereoisómeros de la permetrina (PM) de frutas y verduras usando SUPRAS de hexanol (Capítulo 2 de la Memoria).
- ✓ Los SUPRAS de agregados inversos proporcionan extracciones cuantitativas para los analitos estudiados usando bajas relaciones de volumen de SUPRAS a volumen o peso de muestra, según se trate de muestras líquidas o sólidas (1,4  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , 0,4-0,8  $\mu\text{L mg}^{-1}$ , respectivamente) y bajos tiempos de extracción (5-15 min). Además, proporcionan extractos lo suficientemente limpios para ser analizados directamente mediante CLQ-MS/MS, sin necesidad de realizar etapas adicionales de limpieza, necesarias cuando se utilizan disolventes orgánicos como extractantes. Las excelentes prestaciones de estos disolventes en procesos de microextracción se pueden explicar teniendo en cuenta:
  - Su elevada capacidad de solubilización debido a: 1) El elevado número de centros de solubilización disponibles en los agregados de anfífilo que constituyen el SUPRAS. La concentración de ácido decanoico y hexanol en los SUPRAS usados para realizar las extracciones es de 0.75  $\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$ . 2) La capacidad de las moléculas de anfífilo que constituyen los agregados en el SUPRAS para establecer enlaces intermoleculares con los analitos mediante distintos tipos de interacciones que actúan de forma cooperativa.
  - Su elevada área superficial debido a su carácter discontinuo, al estar constituidos por gotas de coacervado, lo que facilita la transferencia de los analitos de la muestra al SUPRAS reduciendo los tiempos de extracción.

- Su comportamiento como materiales de acceso restringido, lo que permite la extracción de moléculas de pequeño tamaño (analitos) sin que se produzca la extracción de macromoléculas presentes en las muestras (ej. proteínas, polisacáridos, ácidos húmicos, etc.), proporcionando de este modo extractos más limpios que los obtenidos usando disolventes orgánicos como extractantes.
- ✓ La composición (concentración de anfífilo, THF y H<sub>2</sub>O) y nanoestructura de los SUPRAS no afectan a la eficacia de la extracción obtenida para ninguna de las matrices investigadas, lo que permite desarrollar métodos de extracción muy robustos.
- ✓ La composición y nanoestructura de los SUPRAS influye en la limpieza de los extractos. Los extractos más limpios se obtienen con SUPRAS con una elevada concentración de anfífilo y bajo contenido en THF y H<sub>2</sub>O, es decir aquellos sintetizados usando un bajo porcentaje de THF [5 % (v/v) y 1 % (v/v) para SUPRAS de ácido decanoico y hexanol, respectivamente]. Estos disolventes son los que presentan una mayor capacidad para actuar como materiales de acceso restringido al poseer una nanoestructura con un mayor grado de empaquetamiento de las moléculas de anfífilo y menor tamaño de las cavidades acuosas de los agregados hexagonales inversos.
- ✓ El uso de SUPRAS de agregados inversos permite desarrollar procedimientos de microextracción de bajo coste, seguros para los analistas y respetuosos con el medio ambiente al reducir drásticamente el volumen de disolvente usado para la extracción y la cantidad de residuos químicos generados respecto a los métodos basados en el uso de disolventes orgánicos.

Las conclusiones específicas obtenidas a partir de las investigaciones incluidas en el Capítulo 1 de la Memoria de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

- ✓ La capacidad de los SUPRAS de ácido decanoico para formar enlaces de halógeno, un tipo de interacción intermolecular muy enérgica y direccional, los hace especialmente adecuados para la extracción de contaminantes halogenados. La formación del enlace se produce a través del átomo de oxígeno de su grupo C=O, que actúa como donador de electrones y del THF, que es una base de Lewis. El enlace con compuestos con grupos halógeno (R-X) se establece en la dirección perpendicular al enlace R-X, región con un potencial electrostático positivo.
- ✓ La fuerte interacción que se produce entre los estereoisómeros del HBCD y las moléculas de ácido decanoico en los agregados que constituyen el SUPRAS hace posible la

extracción cuantitativa de estos analitos en muestras sólidas (suelos, sedimentos y material biológico) donde se encuentran fuertemente retenidos mediante interacciones con la materia orgánica presente en las muestras, sin necesidad de usar energías auxiliares, invariablemente requeridas cuando estos analitos se extraen usando disolventes orgánicos.

- ✓ La elevada eficacia de extracción proporcionada por el SUPRAS de ácido decanoico para los HBCD permite extraer los analitos cuantitativamente de agua de río (fracción disuelta+particulada y fracción disuelta) con un factor de concentración igual a 720.
- ✓ Los métodos propuestos hasta el momento para separar la fracción disuelta y particulada de aguas de río mediante filtración como etapa previa a la determinación de los HBCD en ambas fracciones no proporcionan resultados exactos debido a la adsorción en los filtros de los HBCD presentes en la fracción disuelta.
- ✓ La centrifugación es más eficiente que la filtración para separar la fracción disuelta y particulada de agua de río, evitando además pérdidas de los HBCD por adsorción en los filtros.
- ✓ Los extractos obtenidos usando el SUPRAS de ácido decanoico como extractante son compatibles con la separación de los estereoisómeros del HBCD [enantiómeros (+) y (-) de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -HBCD] en una columna de  $\beta$ -ciclodextrina y su determinación mediante MS/MS. El disolvente no afecta a la resolución cromatográfica obtenida porque el anfífilo del SUPRAS se solubiliza rápidamente en la fase móvil y se eluye de la columna a un tiempo inferior al que se eluyen los analitos. El envío del eluido de anfífilo a deshecho evita la contaminación de la fuente de ionización del espectrómetro de masas.
- ✓ Los efectos matriz observados para los HBCD en los extractos de muestras de río, suelo y sedimentos en MS/MS se corrigen usando el método de calibración de patrón interno con estándares marcados isotópicamente. Los efectos matriz en muestras de peces son más acusados, requiriéndose la aplicación del método de adición estándar para su corrección.
- ✓ Los métodos desarrollados para la determinación de los HBCD en muestras medioambientales son exactos, precisos y lo suficientemente sensibles para su aplicación en estudios medioambientales (Límites de cuantificación= 0,09-0,9 ng L<sup>-1</sup>, 0,6-2,2 ng g<sup>-1</sup> y 0,5-5,6 ng g<sup>-1</sup> para aguas de río, sedimentos/suelos y peces, respectivamente).

Las conclusiones específicas obtenidas a partir de las investigaciones incluidas en el Capítulo 2 de la Memoria de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

- ✓ El uso de una columna de  $\beta$ -ciclodextrina y gradiente de elución con una mezcla de agua y metanol, ambos con acetato amónico, permite la separación simultánea de los cuatro estereoisómeros de la permetrina [enantiómeros (1R) y 1(S) de los isómeros cis- y trans-PM] y su detección mediante espectrometría de masas en tándem como aductos de amonio.
- ✓ En presencia de disolventes supramoleculares de alcohol (hexanol, octanol, decanol o dodecanol), los tiempos de retención de los analitos disminuyen con la consiguiente pérdida de resolución, debido a la solubilización de los analitos en la pseudofase proporcionada por los agregados de alcohol presentes en la fase móvil.
- ✓ La compatibilización de la extracción con SUPRAS de alcohol y determinación mediante CLQ-MS/MS de los estereoisómeros de la PM en frutas y verduras se consigue eliminando el disolvente supramolecular de los extractos mediante volatilización de sus componentes y redisolución de los analitos en metanol.
- ✓ Los SUPRAS de hexanol solubilizan a los estereoisómeros de la PM mediante diferentes tipos de interacciones (dispersión, dipolo-dipolo y formación de puentes de hidrógeno) proporcionando una elevada eficacia de extracción.
- ✓ Los componentes de la matriz de la muestra extraídos usando SUPRAS de hexanol no causan efecto matriz en la determinación mediante MS/MS de los estereoisómeros de la PM en manzana. Tampoco se produce efecto matriz para los enantiómeros de la trans-PM en tomate, guisantes, col, naranja y pimiento. Los efectos matriz observado para los enantiómeros de la cis-PM en las frutas y verduras investigadas y para (1R)-trans-PM en melón se corrigen usando el método de calibración de patrón interno con estándares marcados isotópicamente.
- ✓ El método desarrollado para la determinación de los estereoisómeros de la PM en frutas y verduras es exacto, preciso y proporciona límites de cuantificación para la determinación de los estereoisómeros ( $0.8\text{--}1.1\text{ ng g}^{-1}$ ) muy inferiores al máximo límite de residuo de permetrina permitido por la EU ( $50\text{ ng g}^{-1}$ ).

**APÉNDICE A:**

**Publicaciones  
científicas derivadas de  
la Tesis**





1. "Enantiomer-specific determination of hexabromocyclododecane in fish by supramolecular solvent-based single-step sample treatment and liquid chromatography-tandem mass spectrometry."  
A. B. Lara, C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio.  
*Analytica Chimica Acta* 752 (2012) 62-68.
2. "Speeding up the extraction of hexabromocyclododecane enantiomers in soils and sediments based on halogen bonding."  
A. B. Lara, C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio.  
*Analytica Chimica Acta* 1027 (2018) 47-56.
3. "Halogen bonding for increasing efficiency in liquid-liquid microextraction: Application to the extraction of hexabromocyclododecane enantiomers in river waters. "  
A. B. Lara, C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio.  
*Journal of Chromatography A* 1600 (2019) 95-104.
4. "Quick and sensitive enantioselective determination of permethrin in fruits and vegetables by combining supramolecular solvents and chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry."  
A. B. Lara, C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio.  
*Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2020) enviado para su publicación.

Los objetivos 1, 3, 4 y 5 de la Tesis Doctoral, especificados al inicio de esta Memoria, se abordan en todos los artículos enumerados anteriormente y el objetivo 2 se aborda en el artículo 4.



## **APÉNDICE B:**

### **Contribuciones a congresos**



**ORAL INTERNACIONAL**

*Supramolecular solvents with restricted access properties for the analytical extraction of chiral compounds in complex matrices.*

Congreso: 6th EuCheMS

Sevilla (España), del 11 al 15 de septiembre de 2016





**Supramolecular solvents with restricted access properties for the analytical extraction of chiral compounds in complex matrices**

**María del Carmen Caballo (1)**, Ana Belén Lara (1), María Dolores Sicilia (1), Soledad Rubio (1)  
(1) University of Cordoba

Department of Analytical Chemistry, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, Cordoba Spain  
Email: calic\_amb@hotmail.es

**Presenting author:** María del Carmen Caballo

**Type:** Oral

**Theme:** G. Physical, Analytical and Experimental Methods in Chemistry

**Topic:** G1. Analytical and Physical Methods

**Keywords:** Supramolecular Solvent, Restricted access properties, Chiral analysis, Liquid chromatography-mass spectrometry

**SUMMARY:**

Ternary mixtures of carboxylic acids ( $C_6$ - $C_{18}$ ), tetrahydrofuran (THF) and water give supramolecular solvents, that behave as restricted access materials (SUPRAS-RAM), through spontaneous self-assembly and coacervation. Carboxylic acids arrange in the SUPRAS as inverted hexagonal aggregates, where the carboxylic groups surround aqueous cavities and the hydrocarbon chains are solvated by THF. The size of the aqueous cavities can be tailored by modifying the THF:water volume ratio in the ternary mixture. These SUPRAS-RAM have the capability of solubilizing small molecules and excluding macromolecules (i.e. proteins, humic and fulvic acids, polysaccharides, etc.) through both physical and chemical mechanisms, so they have the potential to integrate analyte extraction and sample clean-up in a single step. On the other hand, they are excellent extractants for organic compounds in a wide polarity range because of the high number of solubilization sites they contain (viz. amphiphile concentration in SUPRAS-RAM ranges from 0.1 to 1 mg  $L^{-1}$ ), the different mechanisms of interaction they offer (i.e. hydrogen bond, dipole-dipole, dipole-induced dipole, dispersion) and the different polarity regions present in the aggregates making up them.

In this contribution, we show the capability of SUPRAS-RAMs for simplifying sample treatment in chiral analysis of environmental, biological and food samples. The applications developed include the determination of chiral pesticides in natural waters, soils, fruits and vegetables, pharmaceuticals in sewages and freshwater fishes, and flame retardants in natural waters, soils, sediments and fishes. These applications encompass enantiomers in a wide range of polarity (log  $P$ : 3.1-7.6) and samples in a broad range of compositions regarding proteins, carbohydrates, fats, etc. So, conclusions can be generalized and the methodology can be widely applicable in chiral analysis.

Combination of SUPRAS-RAM with chiral liquid chromatographic coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) permitted the direct analysis of SUPRAS-RAM extracts in all the applications developed. Extractions were performed in a few minutes (5-10 min) using conventional laboratory equipment, recoveries were near 100% and concentration factors up to 700 were reached for aqueous samples. Quantification limits for enantiomers of pesticides (mecoprop, diclorprop and cis- and trans-permethrin), pharmaceuticals (ibuprofen, naproxen and ketoprofen) and flame retardants ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -hexabromocyclododecane) were at the low ng  $L^{-1}$  and ng  $g^{-1}$  level for aqueous and solid samples, respectively. The methods were validated *in-house* and their applicability to the determination of enantiomers in real samples proved.

**Acknowledgements:** The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MINECO (Project CTQ2014-53539-R)





**CARTEL INTERNACIONAL**

*Determination of hexabromocyclododecane stereoisomers in fish by supramolecular solvent-based microextraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry.*

Congreso: 6th International symposium on recent advances in food analysis

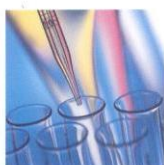
Praga (República Checa), del 5 al 8 de noviembre de 2013

# BOOK OF ABSTRACTS

## 6<sup>th</sup> International Symposium on **RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS**

**November 5–8, 2013  
Prague, Czech Republic**

Jana Pulkrabová, Monika Tomaniová, Michel Nielen and Jana Hajšlová  
Editors



**F-35**  
**DETERMINATION OF HEXABROMOCYCLO-**  
**DODECANE STEREOISOMERS IN FISH BY**  
**SUPRAMOLECULAR SOLVENT-BASED**  
**MICROEXTRACTION AND LIQUID**  
**CHROMATOGRAPHY/TANDEM MASS**  
**SPECTROMETRY**

Ana Belén Lara<sup>1</sup>, María Dolores Sicilia<sup>2</sup>, Soledad Rubio<sup>3\*</sup>

<sup>1,2,3</sup> University of Córdoba, Córdoba, Spain

\*Corresponding author – E-mail: qa1rubrs@uco.es, Phone: 34957218644

A simple and rapid method that combines a single-step sample treatment with chiral liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry was developed for the determination of hexabromocyclododecane (HBCD) stereoisomers in fish. HBCD is an industrial additive consisting of six stereoisomers [(+)- $\alpha$ -, (-)- $\alpha$ -, (+)- $\beta$ -, (-)- $\beta$ -, (+)- $\gamma$  and (-)- $\gamma$ -HBCD] that frequently contaminates natural waters and fishes living in them. The composition of HBCD in fish differs from that of commercial products because the HBCD stereoisomers are absorbed and metabolized at different rates. The most abundant isomers in industrial products and fishes are  $\gamma$ - and  $\alpha$ -HBCD, respectively. Deviation of the enantiomeric ratios [ERs, defined as the molar ratio of (+)- to (-)-enantiomers] from their original value (i.e. ER=1 for racemic mixtures) has been also observed for the three isomers ( $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD). In the proposed method, HBCD stereoisomers were extracted from fish samples with a supramolecular solvent (SUPRAS) made up of reverse aggregates of decanoic acid (DeA) and generated by adding water to a solution of the surfactant in tetrahydrofuran. The sample (750 mg) was vortex-shaken with 600  $\mu$ L of SUPRAS for five minutes, the SUPRAS extract containing the analytes was separated from sample particles by ultracentrifugation and then diluted 1:1 with methanol before its analysis LC/QQQ-MS. Driving forces for the microextraction of HBCD in the SUPRAS involved both dispersion and dipole-dipole interactions. Separation of the HBCD stereoisomers was performed on a stationary phase of  $\beta$ -cyclodextrin and their quantification in a mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source and a triple quadrupole mass analyzer. The extract was large enough to provide the required number of aliquots to apply the standard addition method for determining the target analytes using a single sample. Recoveries were independent of most of experimental parameters, so the method was very robust, and no clean-up steps were applied, that rendering the procedure very simple. Quantitation limits for the determination of HBCD stereoisomers in hake, cod, sole, panga, whiting and sea bass were within the intervals 0.5-5.6 ng g<sup>-1</sup>, and recoveries for fish samples fortified at the ng g<sup>-1</sup> level ranged between 87 and 114% with relative standard deviations from 1 to 10%.

**Keywords:** Hexabromocyclododecane, fish, supramolecular solvents, chiral analysis, LC/MS/MS



## ORAL NACIONAL

*Microextracción con disolventes supramoleculares para la simplificación del tratamiento de muestra en la determinación estereoselectiva de hexabromo-ciclododecano*

Congreso: XIV Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica

Baeza, del 26 al 27 junio 2014

*Simplificación del tratamiento de muestra en análisis quiral con el uso de disolventes nanoestructurados*

Congreso: XIII Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica

Málaga, 8 de junio de 2012

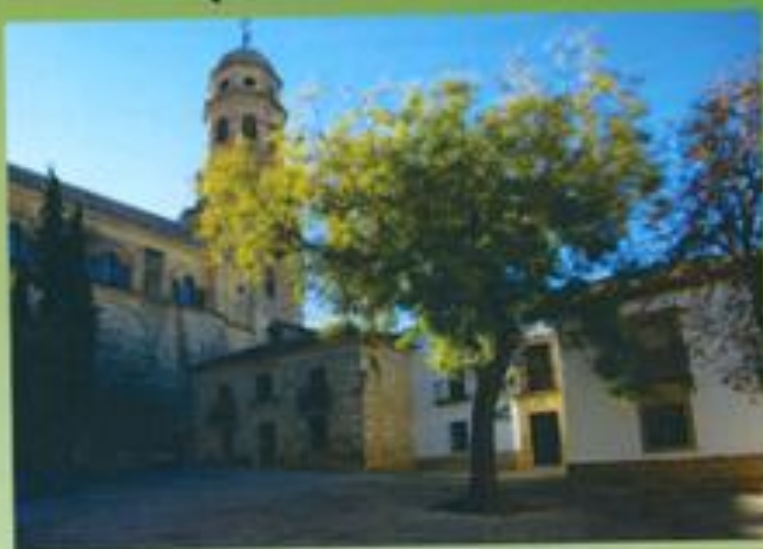
*Disolventes supramoleculares en análisis quiral*

Congreso: NANOUCO IV

Córdoba, del 7 al 8 de febrero de 2013



**XIV REUNIÓN DEL GRUPO REGIONAL  
ANDALUZ DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE  
QUÍMICA ANALÍTICA**



**BAEZA, 26 y 27 junio 2014**



GRUPO REGIONAL ANDALUZ  
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE  
QUÍMICA ANALÍTICA



QUÍMICA ANALÍTICA EN LA  
UNIVERSIDAD DE JAÉN  
PQM-323

CO-09

**MICROEXTRACCIÓN CON DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES PARA LA  
SIMPLIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO DE MUESTRA EN LA DETERMINACIÓN  
ESTEREOSSELECTIVA DE HEXACICLODODECANO**

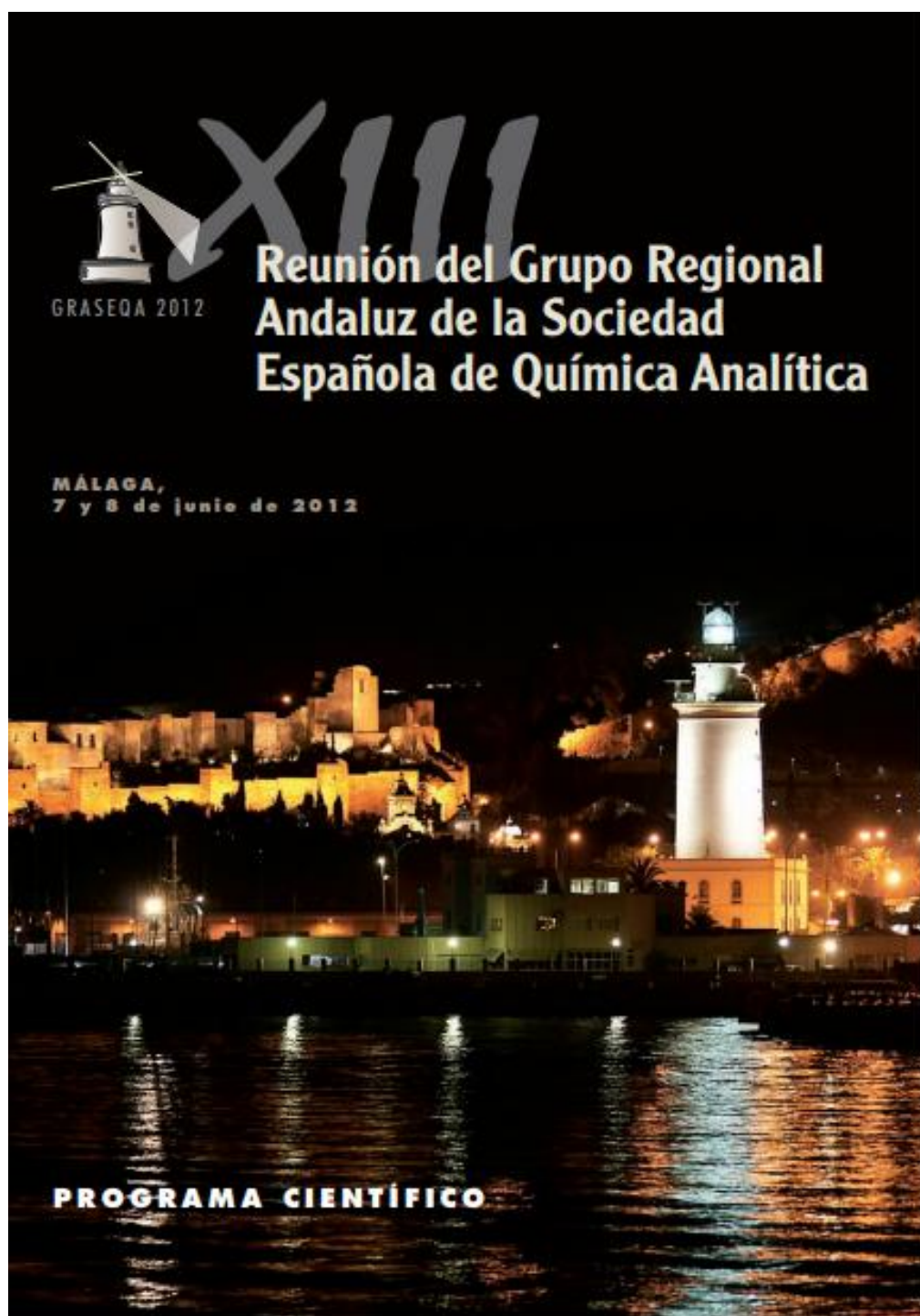
**A.B. Lara, M. D. Sicilia, S. Rubio**

Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba  
Edificio Anexo Marie Curie. Campus de Rabanales, 14071-Córdoba. España  
[g32lafua@hotmail.es](mailto:g32lafua@hotmail.es); [www.uco.es/investiga/grupos/FQM-186](http://www.uco.es/investiga/grupos/FQM-186)

El hexabromociclododecano (HBCD) es un aditivo industrial usado como retardante de llama que llega al medio ambiente fundamentalmente mediante vertidos incontrolados de las industrias productoras del aditivo, pero también mediante su liberación progresiva a partir de productos que lo contienen (tapicería textiles, carcasas de aparatos electrónicos y aislantes de poliestireno usados en construcción). El HBCD es transportado a largas distancias desde los focos de contaminación, es persistente, bioacumulativo y tóxico, por lo que es considerado un contaminante emergente prioritario. El aditivo industrial está constituido por seis estereoisómeros, (+)- $\alpha$ -, (-)- $\alpha$ -, (+)- $\beta$ -, (-)- $\beta$ -, (+)- $\gamma$ - y (-)- $\gamma$ -HBCD, siendo los dos enantiómeros del isómero  $\alpha$  y los que se encuentra en mayor proporción, seguidos de los enantiómeros de los isómeros  $\beta$  y  $\gamma$ . En muestras medioambientales como sedimentos y suelos, el isómero  $\alpha$  sigue siendo el mayoritario, pero la proporción de cada isómero y sus relaciones enantioméricas difieren de las del aditivo industrial debido a la diferente velocidad de degradación de cada estereoisómero. En organismos vivos como los peces, la diferente tasa de bioacumulación y biotransformación de los estereoisómeros da lugar a importantes cambios de composición, siendo el isómero  $\alpha$  el más abundante en este caso. Dada la enantioespecificidad de la toxicidad y del comportamiento del HBCD en el medio ambiente y los seres vivos, una correcta evaluación del riesgo asociado al uso de este aditivo industrial necesariamente pasa por la realización de estudios individualizados para cada estereoisómero, para lo que es fundamental disponer de métodos estereoselectivos de análisis.

La extracción del HBCD en material biológico, suelos y sedimentos se ha realizado tradicionalmente usando extracción Soxhlet y más recientemente, con líquidos presurizados o ultrasonidos, lo que ha permitido reducir los tiempos de extracción, pero no los volúmenes de disolventes usados, ni el tiempo total del tratamiento de muestra que incluye etapas de limpieza y concentración de los extractos. En este trabajo, se propone la microextracción con disolventes supramoleculares para el tratamiento en una sola etapa de muestras biológicas y medioambientales previa a la determinación estereoselectiva del HBCD. El disolvente supramolecular usado como extractante está constituido por agregados inversos de ácido decanoico (ADe), en los que las cadenas del biotensioactivo se encuentran en contacto con tetrahidrofurano (THF) y su grupo polar dirigido hacia el interior del agregado en contacto con agua. La síntesis del disolvente supramolecular se realiza a temperatura ambiente disolviendo ADe en THF y añadiendo agua a pH inferior a 4 en proporción adecuada. El tratamiento de muestra se lleva a cabo en pocos minutos y consiste en la agitación en Vortex de una pequeña cantidad muestra (750 mg de material biológico o 400 mg de suelo/sedimento) con un pequeño volumen de SUPRAS (600 y 250  $\mu$ L, respectivamente) durante 5 minutos, separación del extracto mediante centrifugación durante 10 minutos, dilución del extracto 1:1 con metanol e inyección directa del mismo en el cromatógrafo de líquidos. Los estereoisómeros del HBCD se separan en una columna de  $\beta$ -ciclodextrina permetilada y se determinan mediante espectrometría de masas en tándem usando ionización mediante electrospray y un analizador cuadrupolar. La microextracción en disolvente supramolecular es muy eficaz con independencia de cuál sea la composición de la matriz de la muestra, el método es además simple y rápido, es posible tratar 10 muestras simultáneamente en apenas 20 minutos y no requiere equipamiento especial, el coste es bajo y el consumo de disolventes orgánicos mínimo (12-60  $\mu$ L de THF por muestra). La aplicabilidad de la metodología se ha demostrado analizando muestras de una gran variedad de peces, suelos y sedimentos fluviales fortificados con estereoisómeros de HBCD a concentraciones del orden de  $\text{ng g}^{-1}$  con excelentes resultados. Las recuperaciones variaron entre el 87 y 114% con desviaciones relativas entre el 1 y el 10%.





### Simplificación del tratamiento de muestra en análisis quiral con el uso de disolventes nanoestructurados

C. Caballo, A. B. Lara, M. D. Sicilia, S. Rubio

*Departamento de Química Analítica, Instituto de Química Fina y Nanoquímica,  
Edificio Anexo Marie Curie, Campus de Rabanales, 14071- Córdoba, España  
Teléfono/Fax: 957218644; galrubrs@uco.es; www.uco.es/investig/grupos/FQM-186*

Numerosos compuestos químicos de uso agrícola, industrial y farmacéutico (plaguicidas, principios activos, aditivos, etc.) son quirales. Estos compuestos se utilizan como mezclas racémicas o enantiómeros puros, pero en el medio ambiente se producen importantes cambios de su relación enantiomérica (RE, cociente entre las concentraciones molares de los dos enantiómeros) debido a procesos de biodegradación, interconversión y metabolización enantioselectiva. Además, cada uno de los enantiómeros de un contaminante quiral presenta diferente toxicidad, carcinogenicidad, mutagenicidad, etc. por lo tanto, para realizar una adecuada evaluación de riesgos medioambientales y para la salud humana es fundamental conocer su distribución enantiomérica.

La gran similitud de las estructuras químicas de los enantiómeros, su baja concentración en muestras medioambientales y la complejidad de las matrices hace que la determinación estereoselectiva de contaminantes no sea una tarea fácil. Los métodos descritos hasta la fecha combinan tratamientos de muestra muy laboriosos con técnicas cromatográficas quirales [cromatografía de gases (CG) o cromatografía líquida (CL)] acopladas a espectrometría de masas (EM) para alcanzar la selectividad y sensibilidad necesarias. Los tratamientos de muestra incluyen etapas de extracción, limpieza y concentración de los extractos y en el caso de determinaciones mediante CG-EM de contaminantes polares, derivatización de los analitos.

En este trabajo se propone la microextracción con disolventes supramoleculares previa a CL-EM para la simplificación del tratamiento de muestras medioambientales en análisis quiral. Los disolventes supramoleculares son líquidos nanoestructurados inmiscibles con agua constituidos por agregados de tensioactivo con capacidad para extraer eficazmente una gran variedad de analitos (desde apolares hasta muy polares) debido a que proporcionan diferentes tipos de interacciones (dispersión, dipolo-dipolo, formación de puentes de hidrógeno, etc.) y presentan un elevado número de centros de solubilización. Los disolventes supramoleculares usados en los métodos desarrollados se obtuvieron a partir de mezclas ternarias de ácido decanoico (ADe) o dodecanoico (ADo), tetrahidrofurano (THF) y agua. El disolvente de ADo se utilizó para la extracción de los herbicidas mecoprop (MCP) y diclorprop (DCPP) en muestras de aguas naturales y el disolvente de ADe, para la extracción de hexabromociclododecano (HBCCD, un retardante de llama usado como aditivo en aislantes poliméricos, tapicerías y carcassas de aparatos eléctricos) en muestras de peces. Los enantiómeros R y S del MCP y el DCPP y los tres pares de enantiómeros correspondientes a los tres isómeros ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) del HBCCD se separaron en fases estacionarias de  $\alpha$ -ciclodextrina permetilada y de  $\beta$ -ciclodextrina, respectivamente. La cuantificación de los enantiómeros se realizó mediante espectrometría de masas en tandem usando un triple cuadrupolo con fuente de ionización por electrospray. Los métodos desarrollados son más rápidos y simples que los descritos hasta el momento y proporcionan muy bajos límites de cuantificación (inferiores a 5 ng L<sup>-1</sup> y 10 ng g<sup>-1</sup> para la determinación de enantiómeros de herbicidas en aguas y enantiómeros de HBCCD en peces, respectivamente).



**LIBRO DE RESÚMENES**

**NANOUCO IV**

Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología  
de Investigadores y Tecnólogos Andaluces



**Córdoba, 7 y 8 de Febrero 2013**



## O6-CFQ

## DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES EN ANÁLISIS QUIRAL

**C. Caballo, A.B. Lara, M.D. Sicilia, S. Rubio***Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba**Edificio Anexo Marie Curie. Campus de Rabanales, 14071- Córdoba. España**Teléfono/Fax: 957 218644; qa1ruhrs@uco.es; [www.uco.es/investigacion/grupos/FQM-186](http://www.uco.es/investigacion/grupos/FQM-186)*

Los disolventes supramoleculares, líquidos nanoestructurados constituidos por agregados tridimensionales de moléculas anfífilas, presentan una serie de características que los hacen especialmente adecuados para su uso como extractantes en procesos analíticos: capacidad para solubilizar analitos en un amplio intervalo de polaridades, elevada eficacia de extracción debido a la presencia de un elevado número de centros de solubilización, baja toxicidad e inflamabilidad y bajo coste. Además, determinados disolventes supramoleculares, como es el caso de los constituidos por agregados de ácidos alquilcarboxílicos, actúan como materiales con propiedades de acceso restringido, es decir, presentan baja eficacia de extracción para macromoléculas como proteínas, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, lo que permite obtener extractos más limpios que los que se obtienen usando disolventes orgánicos en la extracción de material biológico, suelos y otras muestras complejas. Investigaciones recientes desarrolladas por nuestro grupo de investigación han demostrado que las excelentes prestaciones de los disolventes supramoleculares de ácidos alquilcarboxílicos permiten simplificar los procesos de tratamiento de muestra en análisis quiral.

El análisis quiral implica la determinación de enantiómeros (imágenes especulares) de compuestos quirales o incluso enantiómeros de los diferentes isómeros de estos compuestos, a concentraciones bajas en muestras complejas. Dada la complejidad de este tipo de análisis, a día de hoy, los métodos enantioselectivos descritos son escasos y muy laboriosos. Generalmente incluyen varias etapas de extracción, limpieza y concentración de los extractos obtenidos, separación de los analitos mediante cromatografía quiral líquida o de gases y determinación de los mismos mediante espectrometría de masas. En los métodos propuestos por nuestro grupo de investigación, los analitos quirales se extraen de muestras líquidas y sólidas en una única etapa utilizando un pequeño volumen de disolvente supramolecular y se determinan directamente en los extractos usando cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas en tándem. De esta forma se consigue reducir drásticamente el tiempo de análisis y el consumo de disolventes orgánicos.

Los disolventes supramoleculares usados se forman espontáneamente a temperatura ambiente en disoluciones de ácido alquilcarboxílico (ácido decanoico o dodecanoico) en tetrahidrofurano (THF) mediante la adición de agua. La extracción de muestras líquidas implica la adición de la muestra a la disolución de tensioactivo, lo que origina la formación de un pequeño volumen de disolvente supramolecular en el que se extraen los analitos con la ayuda de agitación magnética. En el caso de muestras sólidas, el disolvente supramolecular previamente sintetizado se utiliza para extraer los analitos con la ayuda de agitación en vortex. Hasta el momento, se han desarrollado métodos para la determinación de los enantiómeros R y S de dos herbicidas quirales el mecoprop (MCPP) y el diclorprop (DCPP) en aguas de río, aguas subterráneas y suelos y los tres pares de enantiómeros de los tres isómeros ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) del hexabromociclododecano (HBCD), un retardante de llama usado como aditivo industrial, en sedimentos de río, suelos y diferentes especies de peces. Los métodos desarrollados presentan la sensibilidad, selectividad, exactitud y precisión requerida en análisis quiral y son mucho más simples y rápidos que los métodos descritos en la bibliografía para estos analitos.





## CARTEL NACIONAL

*Disolventes supramoleculares con propiedades de acceso restringido para el tratamiento de muestras para análisis quiral medioambiental y alimentario.*

Congreso: VI Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología de investigadores y tecnólogos andaluces (NANOUCO)

Córdoba, del 25 al 26 de enero de 2017

*Disolventes nanoestructurados con propiedades de acceso restringido para el tratamiento simple y rápido de muestras complejas en análisis quiral*

Congreso: XV-Reunión Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica

Almería, del 30 de junio al 1 de julio de 2016

*Determinación Enantioselectiva de hexabromociclododecano en suelos y sedimentos de río mediante microextracción en un disolvente supramolecular y cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas en tándem*

Congreso: XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica

Úbeda, del 16 al 18 de junio de 2013

*Supramolecular Solvent-based microextraction and chiral liquid chromatography tandem mass spectrometry for determination of hexabromociclododecane stereoisomers in fish*

Congreso: NANOUCO IV

Córdoba, del 7 al 8 de febrero de 2013

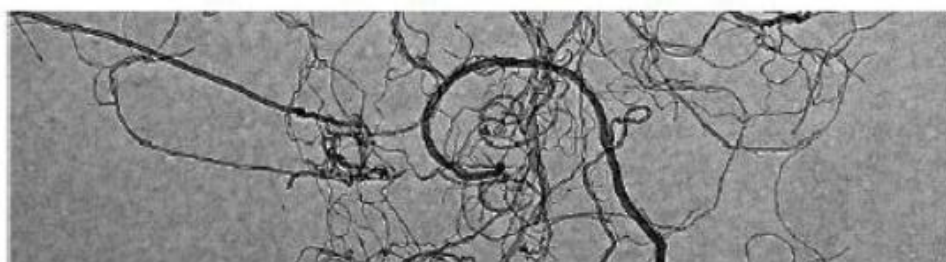
**Sexta Edición del Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología  
de Investigadores y Tecnólogos Andaluces**



**Córdoba, 25 y 26 de Enero de 2017**

**Aula Magna. Aulario Averroes**

**Campus Universitario de Rabanales. Universidad de Córdoba**



**LIBRO DE RESÚMENES**



## P33-CA

# DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES CON PROPIEDADES DE ACCESO RESTRINGIDO PARA EL TRATAMIENTO DE MUESTRA EN ANÁLISIS QUIRAL MEDIOAMBIENTAL Y DE ALIMENTOS

C. Caballo, A.B. Lara Fuentes, M.D. Sicilia Criado, S. Rubio Bravo

Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba  
Edificio Anexo Marie Curie. Campus de Rabanales, 14071-Córdoba. España  
calic\_amb@hotmail.es, [www.uco.es/sac](http://www.uco.es/sac)

En esta comunicación se muestran los resultados obtenidos en la evaluación del uso de disolventes supramoleculares de ácidos alquilcarboxílicos (alkylcarboxylic acid-based supramolecular solvents, ACA-SUPRAS) y alcoholes (alcohol-based supramolecular solvents, AK-SUPRAS) para el tratamiento de muestras medioambientales y de alimentos previa a la determinación de estereoisómeros de contaminantes quirales. Estos contaminantes llegan al medio ambiente y a los alimentos mediante su uso como plaguicidas, fármacos o aditivos industriales. Los estereoisómeros de los contaminantes quirales presentan diferente velocidad de degradación y metabolización y diferente toxicidad, por lo que es fundamental su determinación individual para la correcta evaluación de los riesgos medioambientales y para la salud pública asociados a estos contaminantes.

Los ACA-SUPRAS y los AK-SUPRAS son líquidos constituidos por agregados de ácidos alquilcarboxílicos (ACA) o alcoholes (AK) formados mediante un proceso de coacervación. La adición de agua a una disolución de ACA o AK en tetrahidrofurano da lugar a la formación de nanoestructuras que se separan de la disolución hidroorgánica como una segunda fase líquida, el ACA-SUPRAS o AK-SUPRAS. En estas nanoestructuras, las moléculas de compuesto anfílico (moléculas de ACA o de AK) dirigen sus grupos polares hacia el interior en contacto con el agua y sus cadenas hidrocarbonadas hacia el exterior en contacto con el disolvente orgánico formando agregados inversos en una disposición hexagonal. Las dimensiones de las cavidades acuosas del disolvente supramolecular varían en función del porcentaje relativo de tetrahidrofurano y agua usados en la síntesis y, de las dimensiones de estas cavidades acuosas, depende el tamaño de las sustancias que pueden penetrar en las nanoestructuras y solubilizarse en el disolvente. Por lo tanto, mediante el control de las condiciones experimentales durante la síntesis se obtienen disolventes con capacidad de solubilización selectiva de sustancias en función de su tamaño, es decir disolventes que actúan como materiales de acceso restringido (supramolecular solvent-restricted access material, SUPRAS-RAM).

Usando SUPRAS-RAM con capacidad para solubilizar sólo sustancias de bajo peso molecular para el tratamiento de muestras medioambientales y alimentos es posible diseñar esquemas de tratamiento de muestra que integran en una sola etapa la extracción de los analitos y limpieza de los extractos, excluyendo macromoléculas presentes en las muestras (ej. Ácidos húmicos y fúlvicos, polisacáridos, proteínas, etc.). Esta estrategia se ha utilizado con éxito en el tratamiento de una gran variedad de muestras (aguas superficiales y subterráneas, suelos, sedimentos y tejido animal y vegetal) previa a la determinación estereoselectiva de contaminantes quirales a bajas concentraciones (del orden de los  $\text{ng L}^{-1}$  y  $\text{ng g}^{-1}$  en muestras líquidas y sólidas, respectivamente) mediante cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas en tándem. Los contaminantes determinados incluyen: plaguicidas (mecoprop, diclorprop, cis-permetrín y trans-permetrín), fármacos (ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno) y aditivos industriales ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ - hexabromociclododecano). Los métodos desarrollados son exactos, precisos y robustos, lo que demuestra la utilidad de los SUPRAS-RAM para el desarrollo de métodos de análisis quiral en muestras complejas.





XV REUNIÓN DEL GRUPO REGIONAL  
ANDALUZ DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE  
QUÍMICA ANALÍTICA



Almería, 30 de junio y 1 de julio de 2016



GRUPO REGIONAL ANDALUZ  
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE  
QUÍMICA ANALÍTICA



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

## NAO-03

**DISOLVENTES NANOESTRUCTURADOS CON PROPIEDADES DE ACCESO  
RESTRINGIDO PARA EL TRATAMIENTO SIMPLE Y RÁPIDO DE MUESTRAS  
COMPLEJAS EN ANÁLISIS QUIRAL**

**C. Caballo, A.B. Lara Fuentes, M.D. Sicilia Criado, S. Rubio Bravo**

Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba  
Edificio Anexo Marie Curie. Campus de Rabanales, 14071-Córdoba. España  
calic\_amb@hotmail.es, [www.uco.es/sac](http://www.uco.es/sac)

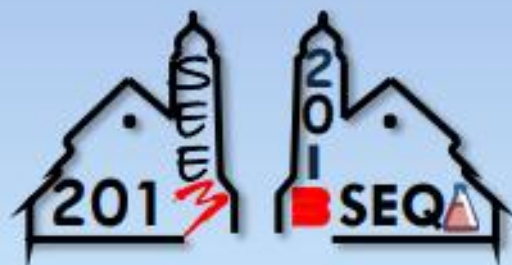
Las investigaciones realizadas por nuestro grupo en el ámbito del análisis quiral han demostrado que la microextracción con disolventes supramoleculares con propiedades de acceso restringido (SUPRAS-RAM-ME) es una potente herramienta en tratamientos de muestra previos a la determinación enantioselectiva de compuestos quirales a baja concentración en matrices complejas. Los SUPRAS-RAM son líquidos constituidos por agregados de tensioactivo que solubilizan selectivamente analitos de bajo peso molecular, excluyendo macromoléculas presentes en la matriz de la muestra como proteínas, polisacáridos y ácidos húmicos y fúlvicos. Estos disolventes presentan una elevada eficacia de extracción para analitos con diferente estructura química debido a que la solubilización se puede producir en regiones de diferente polaridad dentro de los agregados, y a que poseen un elevado número de centros de solubilización (las concentraciones de tensioactivo en el disolvente alcanzan valores de hasta 4 M). Su elevada capacidad de extracción permite realizar extracciones cuantitativas usando bajos volúmenes de SUPRAS-RAM y por tanto, obtener elevados factores de concentración, y sus propiedades de acceso restringido posibilitan la obtención de extractos que pueden ser analizados directamente sin necesidad de realizar etapas adicionales de limpieza.

Los SUPRAS-RAM se generan espontáneamente en disoluciones hidro-orgánicas de ácidos alquilcarboxílicos (AAC) o alcoholes (AC), dependiendo su composición, nanoestructura y capacidad de extracción de la proporción disolvente orgánico-agua usada en su síntesis. En mezclas de tensioactivo-tetrahidrofurano (THF)-H<sub>2</sub>O, la concentración de tensioactivo en el SUPRAS-RAM disminuye y la proporción de H<sub>2</sub>O y THF aumenta a medida que se incrementa la concentración de disolvente orgánico usada para generar el disolvente supramolecular. Este cambio en la composición del disolvente va asociado a un cambio en su nanoestructura. Las moléculas de AAC o AC se asocian formando agregados hexagonales inversos con la cadena hidrocarbonada del tensioactivo dirigida hacia el THF y su grupo polar orientado hacia una cavidad acuosa. El tamaño de esta cavidad disminuye a medida que lo hace la proporción de H<sub>2</sub>O y THF en el SUPRAS-RAM, condicionando el tamaño de los compuestos polares que se solubilizan en los agregados.

La combinación de SUPRAS-RAM-ME con cromatografía líquida quiral-espectrometría de masas (CLC-MS) ha permitido desarrollar métodos simples y rápidos para la determinación enantioselectiva de compuestos quirales en un amplio intervalo de polaridades (log P: 3,1-7,6) a muy baja concentración (del orden de los ng L<sup>-1</sup> y ng g<sup>-1</sup> en muestra líquidas y sólidas, respectivamente) en una gran variedad de matrices (aguas naturales y residuales, suelo, sedimentos, peces, frutas y verduras). Los analitos determinados incluyen enantiómeros de plaguicidas (mecoprop, diclorprop, cis-permetrina y trans-permetrina), fármacos (ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno) y aditivos industriales ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ - hexabromociclododecano). Los métodos desarrollados se han validado y aplicado al análisis ambiental, biológico y de alimentos.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen la subvención recibida del MINECO (Proyecto CTQ2014-53539-R) y de los Fondos Feder. C. Caballo agradece el contrato postdoctoral subvencionado por el CEICyE de la Junta de Andalucía.

## XVIII REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA



## VI REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS



Úbeda, 16-19 junio 2013





## MA-42

**DETERMINACIÓN ENANTIOSELECTIVA DE HEXABROMOCICLODODECANO EN SUELOS  
Y SEDIMENTOS DE RÍO MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN UN DISOLVENTE  
SUPRAMOLECULAR Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA QUIRAL ACOPLADA A  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM**

**A.B. Lara, M. D. Sicilia, S. Rubio**

Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba  
Edificio Anexo Marie Curie. Campus de Rabanales, 14071-Córdoba. España  
Qa1rubrs@uco.es

El hexabromociclododecano (HBCD) es un contaminante emergente recientemente incluido en la lista de compuestos prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) debido a su ubicuidad, persistencia, capacidad de bioacumulación y toxicidad. Dada su hidrofobicidad y bajas solubilidad en agua, éste contaminante se encuentra fundamentalmente enlazado a la materia orgánica de sedimentos y suelos. El aditivo industrial está constituido por tres isómeros ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), cada uno de ellos con dos enantiómeros en relación racémica, es decir seis estereoisómeros en total [(+)- $\alpha$ -, (-)- $\alpha$ -, (+)- $\beta$ -, (-)- $\beta$ -, (+)- $\gamma$ - y (-)- $\gamma$ -HBCD], siendo el isómero  $\gamma$  el más abundante. Aunque en sedimentos y suelos el isómero  $\gamma$  sigue siendo el mayoritario, se han observado cambios en su relación isomérica y enantiomérica [relación molar de enantiómero (+) a enantiómero (-)] respecto a la encontrada en el aditivo industrial, debido a procesos de biodegradación selectiva previos a la absorción del HBCD en las partículas de suelo y sedimento. Dado que los diferentes estereoisómeros del HBCD presentan diferente toxicidad, es fundamental determinar no sólo el contenido total del contaminante, sino también la concentración de cada uno de sus estereoisómeros en estas matrices para una correcta evaluación del grado de contaminación ambiental debida a este compuesto.

El método estándar para la determinación de HBCD en suelos y sedimentos consiste en extracción Soxhlet con disolventes orgánicos (ej. acetona: hexano 1:1) durante al menos 24h, seguida de concentración y limpieza de los extractos mediante extracción en fase sólida en sílica y/o alúmina, eliminación del disolvente en corriente de nitrógeno y redisolución en metanol. Recientemente se han propuesto métodos de extracción con el uso de líquidos presurizados y asistidos por ultrasonidos que reducen el volumen de disolventes consumido y el tiempo de tratamiento de muestra, pero éstos aun son elevados. La determinación del HBCD total en los extractos se realiza mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y en el caso de la determinación de isómeros o estereoisómeros, es necesario el uso de cromatografía líquida para evitar cambios en la composición estereoquímica del HBCD. Los disolventes supramoleculares (SUPRAS), líquidos nanoestructurados constituidos por agregados tridimensionales de tensioactivo, constituyen una ventajosa alternativa a los disolventes orgánicos en procesos de extracción fundamentalmente debido a su elevada capacidad para solubilizar compuestos en un amplio intervalo de polaridades, lo que permite desarrollar métodos que proporcionan elevados rendimientos de extracción en tiempos muy reducidos (pocos minutos) usando pequeños volúmenes de SUPRAS (del orden de los microlitros). Así, se ha desarrollado un método para la microextracción de HBCD en suelos y sedimentos que consiste en la agitación Vortex de 400 mg de suelo o sedimento con 250  $\mu$ L de un disolvente supramolecular constituido por agregados de ácido decanoico en tetrahidrofurano/agua durante 5 minutos, separación del extracto mediante centrifugación durante 10 minutos, dilución del extracto 1:1 con metanol e inyección directa del mismo en el cromatógrafo de líquidos. Los estereoisómeros del HBCD se separan en una columna de  $\beta$ -ciclodextrina permitilada y se determinan mediante espectrometría de masas en tándem usando ionización mediante electrospray y un analizador cuadrupolar. El método desarrollado es eficaz (extracción cuantitativa), rápido (tratamiento de 10 muestras simultáneamente en apenas 20 minutos), simple (no requiere equipamiento especial), con bajo coste y respetuoso con el medio ambiente. Los límites de cuantificación obtenidos en suelos y sedimentos variaron entre 0,1 y 0,6 ng g<sup>-1</sup> y los rendimientos de extracción entre el 93 y el 102 % con desviaciones estándar relativas entre el 1 y el 8 %.



**LIBRO DE RESÚMENES**

**NANOUCO IV**

Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología  
de Investigadores y Tecnólogos Andaluces



**Córdoba, 7 y 8 de Febrero 2013**



## SUPRAMOLECULAR SOLVENT-BASED MICROEXTRACTION AND CHIRAL LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR THE DETERMINATION OF HEXABROMOCYCLODODECANE STEREOISOMERS IN FISH.

**A.B. Lara, C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Bravo**

*Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba Edificio Anexo Marie Curie. Campos de Rabanales, 14071- Córdoba. España.  
qa1rubrs@uco.es*

Hexabromocyclododecane (HBCD) is a brominated flame retardant used as an additive in polystyrene foams for thermal insulation of buildings, in upholstery textiles and in electrical equipment housings. The industrial additive mainly consists of racemic mixtures of three diastereoisomeric pairs of enantiomers, the  $\gamma$ -isomer being the most abundant, followed by the  $\alpha$ - and  $\beta$ -ones. In the last years, the abundance of HBCD in the environment has greatly raised, which together its persistence, bioaccumulative properties and toxicity, has made it an emerging contaminant of very high concern. It is often present in fishes,  $\alpha$ -HBCD being the most abundant isomer. The composition of HBCD in fish differs from that of commercial products because the HBCD stereoisomers are absorbed and metabolized at different rates and suffer bioisomerization, with a preferential formation of the  $\alpha$ -isomer. Deviation of the enantiomeric ratios [ERs, defined as the molar ratio of (+)- to (–)-enantiomers] from their original value (i.e. ER=1 for racemic mixtures) has been also observed for the three diastereoisomeric pairs.

This work deals with the development of a simple and rapid method for the quantitation of the six stereoisomers of HBCD [(+)- $\alpha$ -, (–)- $\alpha$ -, (+)- $\beta$ -, (–)- $\beta$ - and (+)- $\gamma$ -HBCD] in fish. Reported methods for the stereoselective determination of HBCD in fish samples invariably involve liquid chromatography (LC) with mass spectrometry (MS) detection after a multiple-step sample treatment including extraction by Soxhlet or accelerated solvent extraction (ASE) and clean-up by gel permeation chromatography followed by SPE and/or sulphuric acid treatment. The method developed by our research group permitted to determine individual HBCD stereoisomer at concentrations at the low ng g<sup>-1</sup> level in fish using a single-step sample treatment approach based on supramolecular solvent-based microextraction (SUSME). The target analytes in fish samples (750 mg) were extracted in a low volume (600  $\mu$ L) of a supramolecular solvent (SUPRAS) made up of reverse aggregates of decanoic acid (DeA) and the extracts were directly analysed by LC-MS after dilution 1:1 with methanol. The HBCD stereoisomers were separated on a stationary phase of  $\beta$ -cyclodextrin and quantified in a mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source and a triple quadrupole mass analyzer. The SUSME approach permitted to extract ten samples simultaneously in about 20 minutes and it afforded recoveries near to 100% for all the fish species tested (hake, cod, sole, panga, whiting and sea bass). The high extraction efficiency obtained could be explained on the basis of the different interaction mechanisms provided by the supramolecular solvent (dispersion interactions between the hydrophobic moieties of the target analytes and the hydrocarbon chains of the DeA molecules forming aggregates in the SUPRAS and dipole-dipole interactions between the bromine groups of the target analytes and the carboxylic groups of DeA) and the high number of solubilisation sites of the solvent (the concentration of DeA in the SUPRAS is about 0.8 mg  $\mu$ L<sup>-1</sup>). Besides efficient, the method developed is accurate, precise, robust and it surpassed to previously reported approaches in simplicity and rapidity.

